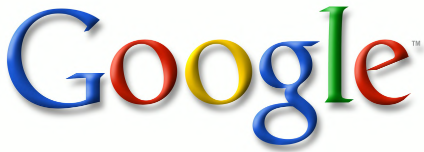
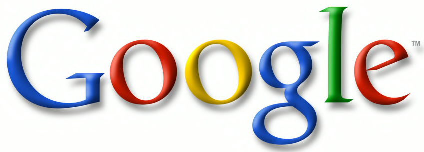





COUNTWAY LIBRARY
HC 2MST 0



Grundzüge

der

mikroskopischen Technik

für

Zoologen und Anatomen

von

A. B. Lee
in
Genf

und

Paul Mayer
in
Neapel.

Zweite Auflage.

Berlin
R. Friedländer & Sohn
1901.

Druck von A. Hopfer in Burg b. M.

Vorwort zur zweiten Auflage.

Bereits nach reichlich drei Jahren ist es uns vergönnt, mit einer neuen Auflage vor das Publikum zu treten. Ich habe diese Gelegenheit zunächst nach besten Kräften dazu benutzt, allerlei Mängel der früheren Auflage zu verbessern, Fehler in den Zahlenangaben der Vorschriften oder der Citate, wie sie sich nur allzu leicht einschleichen, auszumerzen und nahezu alle Citate selber zu kontroliren. Ferner bringe ich als neu einen Ueberblick über die Methoden der plastischen Rekonstruktion und der sogenannten physiologischen Injektionen. Stark verändert sind die Kapitel über Fixir- und Härtmittel und die Theerfarbstoffe. Die früheren Kapitel 4 (Fixirmittel) und 5 (Härtmittel) hat bereits Lee in der 5. Auflage seines Vade-Mecum (1900) zusammengezogen, und ich bin nun bemüht gewesen, die nicht gerade leichte Materie noch besser zu ordnen und übersichtlicher zu gestalten. Die Kapitel 14 und 16 (Theerfarbstoffe für Kern und für Plasma) sind ebenfalls von mir ziemlich stark abgeändert worden. Zwar hat durch die Berücksichtigung der neuestou oft sehr subtilen Methoden, deren Zahl noch stetig wächst, ohne dass dafür ebensoviele ältere unterdrückt werden könnten, sowie durch die Beschreibung mancher fast elementarer Handgriffe, die schon der Vollständigkeit halber nicht länger fehlen durften, der Umfang des Buches um mehr als zwei Bogen zugenommen; indessen ist dank dem Entgegenkommen der Verlagsfirma der Preis unverändert geblieben.

In der vorigen Auflage wurden alle die Angaben oder Meinungen, für die nur der Eine von uns (Lee) die Verantwortung übernahm, im Texte mit Ich eingeführt, die des Anderen (Mayer) hingegen in Fussnoten untergebracht. In der Vorrede war dies auch hervorgehoben worden, aber, wie ich von mehreren Seiten erfahre, ohne Erfolg. Wir haben daher jetzt die Anmerkungen in den Text aufgenommen und, wo es nöthig erschien, unsere Namen in Klammern beigefügt.

Aus der vorigen Auflage möchte ich folgende Stelle als noch gültig hier wieder abdrucken. „Der Titel des Buches deckt sich in-

sofern nicht ganz mit dem Inhalt, als die Mittel zur Beobachtung der lebenden oder überlebenden Thiere oder Organe nicht darin behandelt werden. Da aber dieses Kapitel der Mikrotechnik sich fast ausschliesslich um die Anwendung von Apparaten, wie heizbaren Objekttischen, pneumatischen Kammern, Kompressorien etc. dreht, und Apparate überhaupt in dem Buche nur nebenher erörtert worden sind, so dürfte die absichtliche Auslassung dieses Abschnittes gerechtfertigt erscheinen. Wer sich für das Neueste auf diesem Gebiete interessirt, sei auf Apáthys Mikrotechnik (p. 209 ff.) verwiesen."

Ebenfalls besteht noch zu Recht mein Monitum der leidigen Art nicht weniger Autoren, ihre Technik entweder gar nicht oder nur unvollkommen anzugeben. Wie ich damals als böse Beispiele citirte das „Gemisch von 2 Theilen Jodgrün auf 1 Theil Säurefuchsin in 10 % Glycerin gelöst" und die „Lösung von gleichen Theilen Eosin und Alaun in 200 Theilen Alkohol", so kann ich jetzt aufwarten mit einem „Gemisch von Pikrinsäure-Sublimat mit einem geringfügigen Zusatze von Essig- beziehungsweise Ameisensäure", einer „43 %igen alkoholischen Alaunkarminlösung" und einer „alkoholischen Sublimatlösung von 15—20 %".

Es wäre wirklich an der Zeit, dass die Vorsteher von Instituten den unter ihnen arbeitenden Anfängern nicht nur die Methoden der Forschung, sondern auch die Art, ihre Resultate klar und doch kurz zu veröffentlichen, beibrächten; freilich scheinen manche von ihnen selbst in ihren eigenen Publikationen hierauf keinen Werth zu legen.

Die Abkürzungen der Zeitschriften sind fast genau wie die im Neapler Zoologischen Jahresbericht, wo sie sich seit langen Jahren bewährt haben. Die viel benutzten Lehrbücher aber mögen hier besonders genannt werden, soweit ihr Titel abgekürzt citirt wird; es sind

Apáthy, S., Die Mikrotechnik der thierischen Morphologie [etc.] 1. Abth. Braunschweig 1896.

Behrens, W., Tabellen zum Gebrauch bei mikroskopischen Arbeiten. 2. Aufl. Braunschweig 1892; 3. Aufl. Braunschweig 1898.

Böhm, A., & A. Oppel, Taschenbuch der mikroskopischen Technik. 3. Aufl. München 1896; 4. Aufl. München 1900.

Carazzi, D., Manuale di tecnica microscopica [etc.]. Milano 1899.

Carnoy, I. B., La Biologie cellulaire. Etude comparée de la cellule dans les deux règnes. Lierre 1884.

Fischer, A., Fixirung, Färbung und Bau des Protoplasmas [etc.]. Jena 1899.

Flemming, W., Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung. Leipzig 1882.

Fol, H., Lehrbuch der vergleichenden mikroskopischen Anatomie [etc.]. 1. Liefg. Die mikroskopisch-anatomische Technik. Leipzig 1884.

Lee, A. B., & L. F. Henneguy, Traité des méthodes techniques de l'anatomie microscopique. 2. éd. Paris 1896.

Ranvier, L., Traité technique d'histologie. 1. éd. Paris 1875—1882; 2. éd. Paris 1888.

Rawitz, B., Leitfaden für histiologische Untersuchungen. 1. Aufl. Jena 1889; 2. Aufl. Jena 1895.

Squire, P. W., Methods and Formulae used in the Preparation of Animal and Vegetable Tissues for Microscopical Examination including the Staining of Bacteria. London 1892.

Whitman, C. O., Methods of Research in Microscopical Anatomy and Embryology. Boston 1885.

Ein * vor einem Citat bedeutet, dass mir die Schrift nicht zugänglich gewesen ist.

Dem alphabetischen Register habe ich wiederum besondere Sorgfalt zugewandt, desgleichen den zahlreichen Verweisungen im Texte. Die unvermeidlichen Nachträge während des Druckes (§ 880—889) sind alle ins Register aufgenommen worden.

Neapel, Zoologische Station, im April 1901.

Paul Mayer.

Berichtigungen.

p. 13 Zeile 14 von unten statt Methode lies Methode von Lo Bianco.
p. 89 Zeile 18 von unten statt Verona lies Milano.
p. 190 Zeile 14 von unten statt Bruns' lies Bruns.
p. 221 Zeile 9 von oben statt sie lies es.
p. 230 Zeile 13 von oben statt }
p. 231 Zeile 17 von unten statt } Dekhuizen lies Dekhuyzen.
p. 232 Zeile 6 von oben statt }
p. 345 Zeile 4 von oben statt 19. Bd. 1881 lies 20. Bd. 1882.
p. 388 Zeile 18 von oben statt Kaliumsulfit lies Kaliumsulfid.
p. 388 Zeile 10 von unten statt Bleisulfit lies Bleisulfid.
p. 410 Zeile 5 von oben statt Mujr lies Muir.
p. 434 Zeile 14 von oben statt Jacquet lies Jaquet.

Inhaltsverzeichnis.

---

1. Kapitel.

Einleitung.

1. Allgemeine Methode. In der heutigen mikroskopischen Anatomie kann man neben den vielen speciellen Methoden eine als die allgemeine oder normale bezeichnen. Dies ist die Methode der Untersuchung an Schnitten, und sie besteht darin, dass man die Objekte sorgfältig fixirt und härtet, mit Alkohol entwässert, einbettet und schneidet, die Schnittserien aber aufklebt, färbt und in Balsam bringt; oder dass man das Objekt bereits vor dem Schneiden färbt und die Schnitte direkt in Balsam legt. So wird in der Regel eine Untersuchung begonnen und sehr oft auch ganz durchgeführt. Specielle Punkte hingegen werden eventuell mit speciellen Methoden untersucht, nämlich durch Beobachtung der lebenden Gewebe in situ oder in sogenannten indifferenten Medien, ferner durch Fixirung mit speciellen Fixirmitteln, Färbung mit speciellen Färbemitteln, Dissociation der Gewebselemente durch Zerzupfen oder Maceriren, Injektion, Imprägnation u. s. w.

In dieser vorläufigen Uebersicht halten wir uns absichtlich nur an die allgemeine Methode und schildern nun kurz den Weg, den man in der Regel die Objekte einschlagen lässt, um aus ihnen brauchbare mikroskopische Präparate zu verfertigen.

Eine kritische Darstellung der Geschichte der wichtigsten Methoden s. bei Apáthy (Mikrotechnik p. 35—140).

2. Vorläufige Behandlung des Objektes. Was zunächst mit jedem Objekte zu geschehen hat, ist die Fixirung seiner histologischen Elemente, und dies gilt sowohl für den Fall, dass sie später geschnitten werden sollen, als auch für jedwede andere weitere Behandlung. Die Elemente sollen aber möglichst getreu in der Beschaffenheit erhalten bleiben, die sie im Momente der Fixirung besassen. In der normalen Histologie, wo man vom lebenden Objekte

ausgeht, wird man also auch die Tödtung so rasch vorzunehmen haben, dass sie keine Veränderungen in den Elementen herbeiführt, und das bringt es mit sich, dass man in der Regel das Fixirmittel selber direkt zum Tödten verwendet. (Ueber die Fälle vom Gegentheil s. im Kapitel 2.) Ferner hat die getreue Fixirung oft zur Folge, dass die Objekte oder wenigstens ihre wesentlichen Elemente hart genug werden, um unverändert alle die weiteren Operationen durchmachen zu können, die zur Herstellung der mikroskopischen Präparate erforderlich sind. Daher ist oft eine besondere Härtung unnöthig. (Ueber die Fälle vom Gegentheil s. im Kapitel 3.) Mithin wird nicht selten durch das Fixirmittel das Objekt zugleich getödtet, fixirt und gehärtet, und man redet daher auch wohl schlechtweg vom Fixiren, wenn man alle drei Vorgänge meint.

In der 1. Auflage dieses Buches ist nach dem Vorgange des englischen Originals die weniger exakte Definition des Begriffes Fixirung, der selber nicht recht fixirt zu sein scheint, beibehalten worden. In der Praxis besteht diese auch zu Recht, besonders deswegen, weil die Fixirmittel fast immer mehr als energisch genug zum Tödten sind, und weil die Härtung, wenn sie nicht bereits vom Fixirmittel geleistet wird, in der Regel mit der Entwässerung (durch Alkohol) zusammenfällt. Da jedoch manches Objekt vor dem Fixiren betäubt werden muss, und da mitunter specielle Härtmittel in Anwendung kommen, so ziehen wir die obige schärfere Definition jetzt vor.

Ist das Objekt wirklich gut fixirt und nöthigen Falles besonders gehärtet worden — Genaueres hierüber s. in Kapitel 4 —, so wird es ausgewaschen, um es nach Möglichkeit von den Spuren des Fixirmittels zu befreien.

Es ist durchaus nicht einerlei, womit man auswäscht. Hat man z. B. mit wässerigen Lösungen von Sublimat, Osmiumsäure, Chromsäure oder chromsauren Salzen fixirt, so darf man mit Wasser auswaschen. Hat man hingegen Pikrinsäure verwandt, so muss man mit Alkohol auswaschen. Dieser Unterschied beruht darauf, dass die zuerst genannten Reagentien (überhaupt alle Salze von Schwermetallen, die zum Fixiren gebraucht werden) mit den Geweben sich zu Verbindungen umsetzen, die in Wasser unlöslich oder wenigstens schwerlöslich sind, also auch durch Waschen mit Wasser nicht leicht entfernt werden; Pikrinsäure hingegen härtet die Gewebe nur wenig und scheint auch keine feste Verbindung mit ihnen einzugehen, da sie durch Wasser oder Alkohol völlig daraus weggeschafft wird. Nimmt man also nach der Pikrinsäure Wasser zum Auswaschen, so bleiben die Gewebe weich und sind der schädlichen Wirkung des Wassers ausgesetzt; deswegen benutzt man Alkohol, der nicht nur die Pikrinsäure entfernt, sondern auch zu gleicher Zeit die Gewebe härtet. Winke über die Art des Auswaschens findet man unten bei den Vorschriften über das Fixiren angegeben, so weit sie nöthig sind.

3. Weitere Behandlung des Objektes. Nach dem sorgfältigen Auswaschen wird das Objekt entwässert: zunächst mit Alkohol von steigender Stärke, dann mit absolutem Alkohol (von 100 %); dann wird es mit einem Mittel zur Entfernung des Alkohols (gewöhnlich einem ätherischen Oel oder einem Kohlenwasserstoff) behandelt und zuletzt entweder in ein Harz (z. B. Kanadabalsam s. § 5) gebracht oder zum Schneiden in Paraffin eingebettet (§ 6).

Die ausschliessliche Behandlung mit wässerigen Flüssigkeiten (Färbemitteln, Glycerin etc.) dagegen ist nur für ganz specielle Zwecke im Gebrauch, und selbst die vorläufige Aufbewahrung des Objektes darin (s. § 4) bildet nur eine Ausnahme.

Falls zum Auswaschen Alkohol dient (s. oben), so entwässert dieser die Objekte bereits zum Theil, braucht also nur noch durch ganz starken ersetzt zu werden.

Das Wegschaffen des Wassers aus den Objekten geschieht aus zwei Gründen: 1) der Konservirung halber, da seine Gegenwart die Zersetzung des todten Objektes begünstigt, und 2) weil es die Durchtränkung des Objektes mit der Einbettmasse (für das Schneiden) oder dem Harz (für den definitiven Einschluss) verhindern würde. Wässerige Medien dienen nämlich nur ausnahmsweise zum Einbetten oder Einschliessen (s. hierüber die einschlägigen Kapitel). Beim Entwässern muss natürlich das Objekt in dem erst schwachen, später stärkeren Alkohol jedesmal so lange bleiben, bis es völlig damit durchtränkt ist; auch muss der Alkohol rein sein, namentlich darf er weder sauer noch alkalisch reagiren (§ 99).

Handelt es sich um äusserst zarte Objekte, so muss man zu besonderen Massregeln greifen, um die so schädlichen heftigen Diffusionsströme zu verhüten, die beim Uebergang vom Wasser zum Alkohol oder vom schwachen zum starken Alkohol eintreten. In solchen Fällen sind Diffusionsapparate am Platz, z. B. der von SCHULZE (Sitzungsb. Ges. Nat. Freunde Berlin f. 1885 p. 175; Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 587) oder von KOLSTER (ibid. 17. Bd. 1900 p. 294). Man bringt die Flüssigkeit mit den Objekten in ein Rohr, das an dem einen Ende zugepfropft, am andern durch eine thierische oder sonst brauchbare Membran verschlossen ist, versenkt das Rohr in Alkohol von der gewünschten Stärke und lässt es so lange darin, bis die Diffusion durch die Membran den Alkohol zu den Objekten befördert hat. — Auch der Differentiator von COBB (Proc. Linn. Soc. N.-S.-Wales Vol. 5 1890 p. 157; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1890 p. 821) ist empfehlenswerth, oder der bequemere Apparat von HASWELL (Proc. Linn. Soc. N.-S.-Wales Vol. 6 1891 p. 433; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1892 p. 696). Dieser besteht aus zwei Waschflaschen, die mit einander durch ein Glasrohr verbunden sind, und von denen die eine ein

Rohr zum Abfluss des Wassers hat, während die andere durch ein Rohr mit einem Hahn von einem höheren Reservoir aus mit Alkohol von der gewünschten Stärke gespeist wird. Die Objekte kommen mit ihrem Medium in die zuerst erwähnte Flasche, in die andere dagegen giesst man etwas von diesem Medium, und wenn man nun den Alkohol zufliessen lässt, so gelangt er zunächst in die Flasche ohne Objekte, verdünnt sich dort und kann so nur allmählich durch das Verbindungsrohr zu den Objekten hinübertreten.

Einen einfachen Apparat, den Capillarheber, zum Absaugen der Flüssigkeiten beim Fixiren, Färben und Auswaschen suspendirter Blutzellen, Spermazellen, Epithelzellen, Infusorien etc. beschreibt Ewald (Zeit. Biol. 34. Bd. 1897 p. 253; Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1898 p. 204). Es ist ein Heber von etwa 1 mm Weite; das Ende, das eintaucht, ist wieder nach oben gebogen.

Die Siebdosen von Steinach und Suchannek (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 433 und 7. Bd. 1890 p. 159) bestehen aus einer Glasdose mit Deckel und einem hinein passenden Uhrglas voll Löcher, das auf Füsschen ruht, und sind recht bequem nicht nur zum Färben, Auswaschen, Behandeln mit Dämpfen von Reagentien u. s. w., sondern überhaupt für alle Operationen, wobei die Objekte in den oberen Schichten des Reagens schweben müssen. Die Firma Grübler & Hollborn in Leipzig liefert sie in hübscher Form. — Auch Fairchilds Porzellancylinder mit Löchern (Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1896 p. 301) zum Auswaschen sind recht praktisch und noch dazu so klein, dass der Kork, womit sie oben verschlossen werden, sie schwimmend erhält. S. ferner Ewalds Apparate zum Auswaschen von aufgeklebten oder losen Schnitten mit fliessendem Wasser (Zeit. Biol. 34. Bd. 1897 p. 264; Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1898 p. 206), den Trichter von Cruz (Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1898 p. 29) und das Platinsieb von Schaffer (ibid. 16. Bd. 1900 p. 422).

Es wird hier und da angegeben, die Objekte müssten zuletzt unbedingt in absoluten Alkohol gebracht werden. Das ist aber nicht nöthig: meist genügt solcher von 95%, wenigstens so weit nur die Entfernung des Wassers in Frage kommt. Denn das wenige Wasser, das dann noch in den Objekten bleibt, wird durch Einlegen in das sogen. Intermedium (§ 5) entfernt, wenn nur dieses wirklich gut ist So nimmt z. B. Cedernöl das Wasser aus Objekten fort, die in Alkohol von 95% gewesen sind; Bergamottöl thut es schon bei 90%igem und Anilin sogar bei 70%igem Alkohol. Allerdings ist dabei zu berücksichtigen, ob die Gewebe nicht durch die Uebertragung aus dem wasserhaltigen Alkohol in das Intermedium leiden können, und das ist nicht immer mit Sicherheit auszuschliessen. Jedenfalls muss man in solchen Fällen bei der Verdrängung des Alkohols durch das Intermedium recht behutsam verfahren (s. § 5), und in der Regel thut man gewiss gut daran, den Alkohol möglichst absolut zu nehmen.

Einstweilen ist keine Substanz bekannt, die beim Entwässern den Alkohol völlig ersetzen könnte. Zwar hat Parker (Z. Anzeiger 15. Bd. 1892 p. 376) Aceton und Methylal zur Entwässerung von Methylenblau-Präparaten angewandt, und Fish (s. unten § 160) benutzt Aceton sogar direkt zum Fixiren und Entwässern, aber ein vollgültiger Ersatz für den Alkohol bleibt doch noch zu finden. Ueber das Pyridin s. unten § 104.

4. Vorläufige Aufbewahrung des Objektes. Zwar ist als Agens zum Entwässern der Alkohol das beste Mittel, dagegen zum Aufbewahren, wenn es sich um histologische Feinheiten handelt, viel weniger gut. Lässt man die Objekte vor der weiteren Behandlung nur einige Tage lang darin, so treten die schlimmen Wirkungen wohl noch nicht unangenehm hervor. Bleibt er hingegen lange Zeit mit den Objekten in Berührung, so verändert er sie oft beträchtlich: sie werden gar zu hart, schrumpfen, brechen leicht und nehmen lange nicht mehr so gut Farbstoffe an wie zuerst. Jedenfalls ist es nicht rathsam, ihn schwächer als 90%ig zu nehmen. Kultschitzky (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 349) hat vorgeschlagen, die Objekte nach dem Färben und Behandeln mit Alkohol in Aether, Xylol oder Toluol aufzuheben, aber das ist nur eine halbe Massregel. Flemming (Arch. Mikr. Anat. 37. Bd. 1891 p. 687) räth an, sie in einem Gemisch von Alkohol, Glycerin und Wasser zu etwa gleichen Theilen aufzubewahren, und hebt hervor, man könne sie dann jederzeit zum Schneiden durch Behandlung mit reinem Alkohol, zum Zerzupfen oder Präpariren aber durch kurzes Aufweichen in Wasser vorbereiten; auch würden sie nicht so hart und geschrumpft wie Objekte in reinem Alkohol, behielten auch ihre Anziehungskraft für Farben viel besser. Ich (Lee) kann nach reiflicher Prüfung diesen Vorschlag nur warm empfehlen, möchte aber glauben, dass die Wirkung des Gemisches oft durch Hinzufügen von etwa $\frac{1}{2}$—$\frac{3}{4}$% Essigsäure noch besser wird.

Als rein wässeriges Mittel verdient hier das Formol genannt zu werden, das auch den Vortheil gewährt, dass man damit manche Objekte direkt fixiren kann. Näheres darüber s. unten § 106ff.

Material, das lediglich geschnitten werden soll, wird bei Weitem am besten gleich in Paraffin gebracht. Diese Prozedur gewährt eine absolut sichere Konservirung auf viele Jahre. Man kann jederzeit von dem Objekte einige Schnitte machen, muss allerdings dann die Schnittfläche, etwa durch rasches Eintauchen des Blockes in geschmolzenes Paraffin, wieder gegen Luft, Staub etc. schützen. — Cedernöl ist zum Aufbewahren zwar vielleicht eben so gut wie Paraffin, aber weniger bequem.

5. Entfernen des Alkohols durch Intermedien. Ist das Wasser ordentlich aus den Geweben weggeschafft worden, so entfernt man nun den Alkohol und ersetzt ihn durch eine wasserfreie Substanz, meist ein ätherisches Oel oder einen Kohlenwasserstoff, die sich mit

dem Einbett- oder Einschliessmittel klar mischen lässt. (Man nennt diese Operation gewöhnlich das Aufhellen; s. Kapitel 5.) Dabei ist es sehr wichtig, die Objekte aus dem Alkohol in das neue Medium (Intermedium) nur gradatim zu bringen, und dies erreicht man, wenn man es unter den Alkohol fliessen lässt. Man gibt zunächst eine genügende Menge Alkohol in einen Glastubus (ein Uhrglas geht auch, aber Tuben sind in der Regel besser hierfür) und lässt dann mit einer Pipette das Intermedium auf den Boden des Tubus gelangen. (Oder umgekehrt: zuerst das Intermedium in den Tubus und dann den Alkohol vorsichtig darüber!) Jedenfalls mischen sich beide Flüssigkeiten nur langsam. Lässt man nun die Objekte ruhig in den Alkohol hinein sinken, so schwimmen sie Anfangs auf der Grenzfläche zwischen beiden Medien und sinken in Folge der langsamen Mischung ganz allmählich hinunter in die schwerere Flüssigkeit. Sind sie auf dem Boden des Tubus angelangt, so entfernt man den Alkohol mit einer Pipette und hat so die Objekte vom Intermedium durchtränkt; jedoch thut man gut daran, dieses abzugiessen, da es ja noch Spuren von Alkohol enthält, und es durch ganz reines zu ersetzen.

Diese Methode der langsamen Ueberführung ist allgemein anwendbar, wenn Objekte aus leichteren Flüssigkeiten in schwerere gelangen sollen, z. B. aus Alkohol oder Wasser in Glycerin.

Zum Einbetten der Objekte in Celloidin wird als Intermedium ein Gemisch aus Alkohol und Aether genommen, das specifisch leichter als Alkohol ist.

Von hier ab trennen sich die Wege, die das Objekt einzuschlagen hat, je nachdem es ohne Weiteres in Harz gebracht oder erst in Schnitte zerlegt werden soll (§ 6).

6. Einbetten; Behandeln der Schnitte. Die Objekte werden nun eingebettet: man nimmt sie aus dem Intermedium heraus und lässt sie sich mit dem Einbettmedium gründlich durchtränken. Dies besteht entweder aus geschmolzenem Paraffin oder aus einer Lösung von Collodium oder Celloidin. Dann lässt man die Einbettmasse mit den Objekten darin hart werden (s. Kapitel 7 und 8) und schneidet sie mit dem Mikrotom. Die Schnitte klebt man auf den Objektträger fest (s. Kapitel 9), entfernt das Einbettmittel, wenn es Paraffin war, färbt sie auf dem Objektträger, entwässert sie mit Alkohol und bringt sie durch ein Intermedium in Balsam oder ein anderes Harz. Man kann sie freilich auch unaufgeklebt in Uhrgläsern färben, auswaschen,

entwässern etc. (wobei man nöthigenfalls die Einbettmasse vorher auflöst), indessen wird man das nur ausnahmsweise thun, da es viel lästiger ist.

Es ist bei Celloidinschnitten nur selten nöthig oder vortheilhaft, die Einbettmasse aufzulösen: die Schnitte färben sich in der Regel ganz gut und werden meist sammt dem Celloidin entwässert und in Harz gebracht, weil darin das Celloidin ganz durchsichtig wird. Diese Methode ist für grosse Schnitte deswegen vorzuziehen, weil bei sämmtlichen Operationen alle Theile des Schnittes vom Celloidin zusammengehalten werden.

Eine Methode, die zuweilen gute Dienste leistet, hat Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 320) angegeben. Die Paraffinschnitte werden vor dem Aufkleben gefärbt, indem man etwas von dem Färbgemisch auf den Objektträger gibt, die Schnitte darauf zum Schwimmen bringt und sich in der Wärme dehnen lässt. Hierbei färben sie sich zugleich, und man muss dann nur das Färbgemisch durch reichliches Wasser ganz entfernen, dieses selbst ablaufen und die Schnitte gut trocknen lassen. Da sie sich nun direkt in Benzol und von da in Harz überführen lassen, so bleiben manche zarte Färbungen, die sonst der Alkohol beim Entwässern ausgezogen hätte, erhalten. — Schmorl (Die path.-hist. Untersuchungsmethoden Leipzig 1897 p. 38—39) wendet diese Methode in der Pathologie an; Smith (Journ. Anat. Phys. London Vol. 34 1899 p. 151) beschreibt sie mit der Modifikation, dass er die gestreckten Schnitte 12—24 Stunden auf der kalten Färbflüssigkeit schwimmen lässt.

Die besten Gefässe zum Färben etc. der aufgeklebten Schnitte sind wohl hohe, unten flache Glastuben, die mit Glasplatten und übergreifenden Glasdeckeln (weniger gut mit Korken) geschlossen werden und so geräumig sind, dass man 2 Objektträger mit der freien Fläche gegeneinander hineinstellen kann, sodass die Schnitte nicht beschädigt werden. Diese Tuben — geeignete Maasse sind 9—10 cm äussere Höhe und 3—4 cm lichte Weite — gruppirt man dann zu 2 oder mehr Reihen (jede von 6—8 Stück), indem man ihre Basen in passende, etwa 3—4 cm tiefe Löcher in einem dicken Brett versenkt. Die mannigfachen Vorkehrungen zur Unterbringung vieler Objektträger in ein und demselben Gefässe, wie sie von mehreren Autoren beschrieben werden, erscheinen uns als theils zu theuer, theils zu zerbrechlich oder sonst nicht praktisch genug und sollen daher hier nicht weiter besprochen werden.

Stückfärbung. Das Färben der Schnitte auf dem Objektträger ist ziemlich neuen Datums. Früher färbte man die Objekte in toto und schnitt sie dann. Soll das geschehen, so wird das fixirte und ausgewaschene Objekt direkt aus dem Wasser, bei Weitem besser jedoch erst nach der gebräuchlichen Ueberführung in starken Alkohol aus diesem in das Färbmittel gebracht, das je nach Umständen alkoholisch oder wässerig ist; hat das Objekt darin die richtige Zeit verweilt, so wird es ausgewaschen (mit Alkohol oder Wasser etc., s. die Kapitel über das Färben), mit Alkohol ganz entwässert, in

Paraffin oder Celloidin geschafft und geschnitten. Die Ansichten der Forscher gehen darüber, ob man vortheilhafter das Objekt in toto oder die Schnitte färbt, weit auseinander. Eine allgemeine Regel lässt sich in der That nicht geben, sondern es hängt ganz von der Beschaffenheit der Gewebe (ob sie leicht durchdringbar sind oder nicht, etc.) und dem Zweck der Untersuchung (ob mehr histologisch oder organologisch) ab, wie man zu verfahren hat. In manchen Fällen ist die Stückfärbung ohne Zweifel viel bequemer, sicherer, rascher und den Geweben zuträglicher als die Tinktion der Schnittserien, die ja bei den vielen Manipulationen leicht etwas leiden. Dagegen eignen sich wiederum manche vorzügliche Farbstoffe zur Färbung in toto ganz und gar nicht, weil sie beim Entwässern des Objektes ausgezogen werden.

Auffrischen verblasster Präparate. Nach LEE & HENNEGUY (Traité 2. Ed. 1896 p. 476) stellt man das Präparat in ein Gefäss mit Xylol oder Benzol; ist dann (nach 1—2 Tagen) das Deckglas zu Boden geglitten, so behandelt man das Präparat einige Stunden lang mit reinem Xylol und bringt es durch die Alkohole in das Färbmittel. Verwenden lässt sich diese Methode aber mit Sicherheit nur bei Schnitten, die mit Wasser oder Eiweiss aufgeklebt sind. Bei den mit Schellack aufgeklebten hilft sich MEYER (Biol. Centralbl. 10. Bd. 1890 p. 509) damit, dass er Deckglas und Balsam durch Chloroform entfernt, rasch eine 2%ige Lösung von Photoxylin oder Celloidin aufgiesst, einige Sekunden später den Objektträger in 70%igen, dann zur Lösung des Schellacks in 90%igen Alkohol bringt, darauf in 70%igem das Häutchen mit den Schnitten vom Glase ablöst und nun diese entweder nachfärbt oder direkt wieder in Balsam einschliesst.

Reinigen von Objektträgern und Deckgläsern. Die vielen Vorschriften zur Reinigung neuer und gebrauchter Gläser (s. LEE, 5. Ed. § 888) laufen im Wesentlichen darauf hinaus, dass man neues Glas, wie man es vom Händler erhält, in eine starke Säure (konzentrirte Schwefelsäure, Salpetersäure, Chromsäure, oder Schwefelsäure, Wasser und Kaliumbichromat) legt, gut mit Wasser, darauf mit Alkohol von 90% abspült und mit einem reinen Lappen abtrocknet.

Gebrauchte Objektträger und Deckgläser müssen, wenn sie noch das Präparat selber oder Reste davon (Lackränder etc.) enthalten, zunächst hiervon befreit werden, am einfachsten durch Erwärmen: der Balsam etc. wird weich, und nun schiebt man das Deckglas über den Rand des Objektträgers hinaus und lässt es in ein Gefäss mit gebrauchtem Xylol, Benzol etc. gleiten, worin sich der Balsam spätestens in einigen Tagen verflüssigen wird. Die Objektträger legt man ebenfalls in eine solche Flüssigkeit, aber nicht mit den Deckgläsern zusammen, um Bruch zu vermeiden. Das nächste Bad ist gebrauchter starker Alkohol; sollten sie aber noch nicht ganz rein sein, so kann man sie nach flüchtigem Abtrocknen an der Luft nochmals in das Xylol etc. oder in eine der obigen Säuren bringen.

7. Ueberblick über die Schnittmethode. In der 1. Auflage der englischen Ausgabe dieses Buches (1885) wurde angegeben, man mache die allermeisten Präparate so, dass man die Objekte mit Sublimat oder einem Pikrinsäuregemisch fixire, mit Alkohol auswasche, mit alkoholischem Boraxkarmin färbe, aus Chloroform in Paraffin einbette, mit dem Schlittenmikrotom schneide und die Schnittreihen in Kanadabalsam aufhebe. Seither jedoch hat sich die histologische Praxis stark geändert, und jetzt ist wohl folgender Weg bei Weitem gebräuchlicher: man fixirt je nach Umständen mit Sublimat, Chromosmiumessigsäure oder einem anderen von den weiter unten empfohlenen Gemischen, wäscht aus, entwässert, bettet durch Cedernöl, Benzol etc. hindurch in Paraffin ein, klebt die Schnitte auf dem Objektträger mit Wasser oder Mayers Eiweiss fest, färbt sie (gewöhnlich mit einem Kernfärbemittel) und hebt die Präparate in Balsam oder Dammarharz auf. So oder ungefähr so verfahren jetzt viele der besseren Praktiker; immerhin aber sei dem Anfänger auch jetzt noch jenes einfachere Verfahren empfohlen, da es ihm rasch einen Ueberblick über Form und Lage der Zellen und Kerne seines Objektes verschafft.

Nach Bidder (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 38 1895 p. 33 ff.) schrumpft das Volum der Zellen von Poriferen beim Ueberführen vom Fixirmittel (wässeriger Lösung von Osmiumsäure) durch Alkohol, Benzol und Paraffin in Balsam im besten Falle von 5 auf 4, im schlimmsten sogar von 5 auf 3. Besonders gefährlich ist der Uebergang vom Alkohol in das Intermedium (und bei den zu färbenden Schnitten der umgekehrte Weg), indem hierbei die Zellen auch verzerrt werden. — Broman (Anat. Hefte 1. Abth. 11. Bd. 1899 p. 554) findet bei Embryonen von *Homo* die Schrumpfung durch das Einbetten in Paraffin 8—20% gross.

8. Präparation von ganzen Objekten oder von Material, das nicht geschnitten werden soll. Die Behandlung dieser Objekte ist genau so, wie oben angegeben, mit Ausnahme des Satzes, der sich auf das Einbetten etc. bezieht. In der Regel wird man sie also fixiren, auswaschen, theilweise entwässern, färben, ganz entwässern und in Harz bringen. In diesem als in einem stark lichtbrechenden Medium werden die Objekte durchsichtiger als z. B. in Glycerin, und das ist meist ein Vortheil.

Bei der Behandlung ganzer Objekte oder von Geweben, die durch eine nur schwer von Flüssigkeiten durchdringbare Haut geschützt sind, sind besonders zu vermeiden 1. Quellungen durch Endosmose bei der Ueberführung der Objekte von einer Flüssigkeit in ein andere weniger dichte, 2. Schrumpfung durch Exosmose beim umgekehrten Vorgange. Dies ist vor Allem bei der Uebertragung vom

stärksten Alkohol in das Intermedium zu beachten. Wenn es angeht, so mache man in die Haut einen Schnitt, sodass beide Flüssigkeiten sich direkt mischen können; jedenfalls aber sorge man für ganz langsamen Uebergang, indem man das Intermedium unter den Alkohol bringt (§ 5). Man verwende ferner stets Flüssigkeiten, die leicht eindringen. So sind denn zum Fixiren ein Gemisch mit Pikrinsäure oder eine alkoholische Sublimatlösung (§ 62d) zu benutzen, ferner zum Auswaschen direkt Alkohol von zunehmender Stärke, und Wasser nur dann, wo es durchaus nöthig ist. Ebenso färbe man lieber mit alkoholischen Tinkturen, wie Boraxkarmin, Parakarmin, Hämacalcium etc. Theerfarbstoffe sind hier nur wenig angebracht und wässerige Färblösungen im Allgemeinen auch seltener anwendbar, obwohl sie manchmal zulässig und mitunter sogar vorzuziehen sind.

9. Präpariren kleiner Objekte mit Nadeln. Feine Dissektionen kleiner ganzer Thiere oder Organe unter dem Präparirmikroskope nimmt man oft am besten auf dem Objektträger in einem Tropfen eines Intermediums vor. Hierzu eignet sich besonders Cedernöl, denn es giebt den Geweben eine dafür sehr günstige Konsistenz und verleiht durch seine Zähigkeit zarten Membranen eine gewisse Stütze. In Nelkenöl werden die Objekte nach einiger Zeit sehr brüchig; allerdings ist das mitunter gerade für das Präpariren ein Vortheil. Ferner fliesst das Nelkenöl nicht leicht über den Objektträger hin, sondern bildet gerne Tropfen, und auch diese Eigenschaft ist oft bei feineren Präparationen sehr erwünscht.

Hat man, um die starke Lichtbrechung der Oele zu vermeiden, oder aus anderen Gründen in Glycerin (oder Kaliumacetat etc.) zu präpariren, und sollen die zerschnittenen oder zerzupften Theile, z. B. die Gliedmassen eines kleinen Arthropoden, in bestimmter Lage verharren, so muss man mit möglichst wenig Flüssigkeit operiren und diese auf dem Objektträger glatt ausbreiten, damit keine Tropfen entstehen. Man bestreiche daher zunächst das Glas ganz dünn mit Eiweissglycerin, bringe das Glycerin darauf, mache die Dissektion, ordne die Theile sauber an, lasse das Deckglas senkrecht von oben auf sie fallen und lege sofort mit der anderen Hand ein kleines Gewicht darauf. Nun kann man in Ruhe Glycerin nachfüllen (dass einige kleine Luftblasen unter dem Deckglas bleiben, schadet nicht), mit Wachs einen Rahmen ziehen (s. § 446) und ihn mit Firniss dicht abschliessen.

2. Kapitel.

Tödten.

10. Allgemeines. In der Regel besteht der erste Schritt zur Präparation eines Organs oder eines ganzen Thieres darin, dass man es so rasch und vollständig wie möglich der Wirkung eines Fixirmittels (s. Kapitel 4) aussetzt. Das Organ oder Thier muss also noch leben und in normaler Beschaffenheit sein, und das Fixirmittel soll nun mit ausreichender Geschwindigkeit zugleich den Organismus und seine histologischen Elemente tödten.

Indessen lässt sich diese Methode durchaus nicht immer anwenden. Viele Thiere nämlich, besonders die weichen und skeletlosen, aber sehr kontraktilen, wie manche Cölenteraten, Bryozoen, Serpuliden etc., kontrahiren sich bei solcher Behandlung heftig, ziehen ihre Tentakel oder Kiemen ein und sterben in einem Zustande, der sie zu wahren Karikaturen macht. In solchen Fällen muss man zu besonderen Methoden greifen. Im Allgemeinen lassen sich diese schwierigen Fälle auf zwei Weisen behandeln: man tödtet das Thier plötzlich, sodass es sich nicht mehr zusammenziehen kann, oder man lähmt es zuvor durch Narcotica.

Plötzliches Tödten.

11. Hitze. Zum plötzlichen Tödten ist Hitze sehr gut. Sie erlaubt hinterher eine gute Färbung und hindert weniger als irgend eine andere Methode die Prüfung der Gewebe mit chemischen Reagentien. Auch fixirt sie die Gewebe, während sie den Organismus tödtet. Die Schwierigkeit besteht nur darin, genau die richtige Temperatur zu treffen, die natürlich nach den Objekten verschieden ist. Gewöhnlich reichen 80—90° C. wohl völlig aus, und sehr oft wird man nicht über 60° zu gehen brauchen. In der Regel genügen einige Sekunden des Verweilens in solcher Temperatur.

Kleine Objekte (Protozoen, Hydroiden, Bryozoen) bringt man mit einem Tropfen Wasser in ein Uhrglas oder auf einen Objektträger und erhitzt sie

über einer kleinen Flamme. Bei grösseren Objekten erhitzt man das Wasser oder das Fixirmittel für sich und wirft die Thiere dann hinein.

Sobald man annehmen darf, dass das Protoplasma der Gewebe durch und durch coagulirt ist, muss man die Objekte, falls man sie in Wasser getödtet hat, in 30—70%igen Alkohol oder ein Härtgemisch bringen.

12. Langsam kontraktile Thiere. Thiere, die sich nur langsam kontrahiren, z. B. *Alcyonium* und *Veretillum*, ferner einige Tunikaten, wie *Pyrosoma*, tödtet man mit Vortheil so, dass man sie in eine sehr rasch fixirende Flüssigkeit wirft, die je nachdem kalt oder heiss angewandt wird. Vorzüglich ist hierzu Eisessig oder wenigstens sehr starke Essigsäure, so z. B. für manche Medusen. Je nach ihrer Grösse lässt man die Thiere einige Sekunden oder Minuten darin und bringt sie dann in Alkohol von wenigstens 50% (s. § 81 und 817). Recht gute Resultate bei kleinen Anneliden und Hirudineen hat mir (Lee) Citronensaft gegeben; auch Sublimat wirkt vorzüglich.

Betäuben.

13. Allgemeines. Das ganze Geheimniss bei der Betäubung besteht darin, dass man die Narcotica sehr allmählich und in sehr kleinen Dosen dem Wasser zusetzt, worin die Thiere sind, und ihre Wirkung mit Geduld abwartet.

14. Nikotin. Lo Bianco (Jena. Zeit. Naturw. 13. Bd. 1879 p. 465; Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 449) narkotisirt die Aktinie *Adamsia* mit Tabakrauch. Das Gefäss mit den Thieren kommt unter eine Glasglocke, und eine gebogene Glasröhre oder ein Gummischlauch führt von aussen unter der Glocke durch in das Wasser. Nun bläst man durch Röhre oder Schlauch Tabakrauch in das Wasser und überlässt dann die Thiere 3 Stunden lang sich selbst. Darauf räuchert man wieder, lässt sie über Nacht ruhig stehen und versucht am nächsten Morgen mit einer Nadel, ob die Tentakel noch reizbar sind; sobald diese auf den Stich nicht mehr reagiren, darf man die Betäubung als stark genug erachten. Man vollendet sie mit etwas Chloroform und giesst zuletzt die Fixirflüssigkeit in so reichlicher Menge hinzu, dass die Thiere sterben, bevor sie sich kontrahiren können.

Statt des Tabakrauches lässt sich auch Nikotin verwenden. Andres (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 131) bringt die Aktinie *Edwardsia* zur Betäubung in eine Schale mit 1/2 Liter Seewasser und setzt von einer schwachen Nikotinlösung ganz langsam so viel zu, dass in 12 Stunden etwa 1 g Nikotin auf das Thier eingewirkt hat.

15. Chloroform kann man entweder direkt oder als Dampf brauchen. Korotneff (Mitth. Z. Stat. Neapel 5. Bd. 1884 p. 233) lässt Siphonophoren sich erst in Seewasser ausstrecken, bringt dann Chloroform in

einem Uhrglase auf dem Wasser zum Schwimmen und deckt eine Glasglocke darüber. Sobald die Thiere unempfindlich geworden sind, werden sie mit reichlichen Mengen von heisser Sublimat- oder von Chromsäurelösung getödtet. — Oder man spritzt das Chloroform in kleinen Mengen auf das Wasser mit den Thieren, am besten mit einer ganz feinen Spritze oder Pipette, sodass es ordentlich zerstäubt. Man muss aber jedesmal nur wenig nehmen und alle 5 Minuten die Dosis wiederholen, bis die Thiere betäubt sind. Auf diese Weise habe ich (Lee) grosse Medusen in 1—3 Stunden ausgestreckt und völlig betäubt gefunden. Nach Andres (l. c.) schlägt das Mittel bei Aktinien nicht an, da ihre Gewebe schon vorher maceriren. — Preyer (Mitth. Z. Stat. Neapel 7. Bd. 1886 p. 27) empfiehlt Chloroformwasser zur „Herbeiführung allgemeiner Ruhe“ der Seesterne.

Chloroform (oder auch Bittermandelwasser, also eine ganz schwache Lösung von Blausäure) hat bereits Remak (Arch. Anat. Phys. 1852 p. 153) dem Wasser hinzugefügt, um Larven von *Rana* zu betäuben.

Aether lässt sich ebenso anwenden.

16. Alkohol. Andres (l. c.) hat bei Aktinien gute Resultate mit dem von Lo Bianco erfundenen Gemisch aus 1 Theil Glycerin, 2 Theilen Alkohol von 70 % und 2 Theilen Seewasser erhalten. Man giesst es sorgfältig auf das Wasser mit den Thieren und lässt es ruhig in die Tiefe diffundiren. Mitunter dauert das mehrere Stunden. — Eisig (Fauna Flora Golf. Neapel 16. Monogr. 1887 p. 293) betäubt die Capitelliden durch Einlegen in ein Gemisch von 1 Theil Alkohol von 70 % und 9 Theilen Seewasser und rühmt diese Methode ungemein zur Untersuchung der lebenden Thiere, die jederzeit durch Zurückbringen in reines Seewasser wieder munter werden. Aehnlich Lo Bianco (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 463: 5 % absol. Alkohol). — Cori (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1890 p. 438) findet aber nach Betäubung mit 10 %igem Alkohol die Mitosen schlecht konservirt, empfiehlt dagegen besonders den Methylalkohol, der von allen Alkoholen die Eiweissstoffe am wenigsten angreife. Er verwendet ihn zur Betäubung von allerlei Thieren, und zwar je nach deren Medium entweder mit dem 9fachen an Seewasser oder mit dem 9fachen an Salzwasser (für Süsswasserthiere: auf 90 ccm Wasser 0,6 g Kochsalz, um die Maceration zu verhüten) verdünnt; auch kann man einige Tropfen Chloroform beifügen (so für *Cristatella*; s. Zeit. Wiss. Z. 55. Bd. 1893 p. 627).

17. Chloralhydrat, wohl zuerst von FOETTINGER (Arch. Biol. Tome 6 1885 p. 115) empfohlen, ist für einige Objekte sehr gut. F. wirft Kristalle davon in das Wasser zu den Thieren; für *Alcyonella* nimmt er 0,25—0,80 g Chloralhydrat auf 100 ccm Wasser, und es dauert dann etwa 3/4 Stunden, bevor die Thiere so betäubt sind, dass man sie ausgestreckt fixiren kann. Er hat günstige Resultate mit marinen und anderen Bryozoen, mit Anneliden, Mollusken, Nemertinen, Aktinien und *Asteracanthion* erzielt, jedoch nicht mit Hydroiden, und hält die Procedur für unschädlich, da die Thiere, nach einiger Zeit in reines Wasser gebracht, wieder ganz munter werden. – Nach CORI (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1890 p. 438) soll jedoch diese Behandlung manche Objekte maceriren.

LO BIANCO (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 442) verwendet frisch bereitete Lösungen von Chloralhydrat in Seewasser (1/10 — 1/5 %) für allerlei niedere Seethiere.

VERWORN (Zeit. Wiss. Z. 46. Bd. 1887 p. 100) bringt Süsswasser-Bryozoen (*Cristatella*) auf einige Minuten in eine 10 %ige Lösung von Chloralhydrat, worin sie sich bald ausstrecken. — KÜKENTHAL (Jena. Zeit. Naturw. 20. Bd. 1887 p. 511) hat mit einer Lösung von 1 Th. Chloralhydrat auf 1000 Th. Seewasser an einigen Anneliden gute Erfahrungen gemacht.

18. Cocaïn (richtiger Cocaïnhydrochlorid) gibt nach RICHARD (Z. Anzeiger 8. Jahrg. 1885 p. 332) gute Resultate. R. bringt Bryozoen in ein Uhrglas mit 5 ccm Wasser und setzt allmählich 1/2 ccm einer 1 %igen Lösung von Cocaïn in Wasser hinzu. Nach 5 Minuten wird noch 1/2 ccm der Lösung hinzugesetzt, und 10 Minuten später sind die Thiere völlig ausgestreckt und todt. — Für Rotatorien ist diese Methode nach ROUSSELET (§ 846) die beste. Auch für *Aplysia* ist sie empfohlen worden (§ 820).

LO BIANCO betäubt (nach mündlicher Angabe) Hydroiden, Bryozoen, Mollusken und andere Seethiere, indem er zum Wasser mit den Thieren eine 1—2 %ige Lösung von Cocaïn in Seewasser hinzusetzt.

CORI (s. oben) macht darauf aufmerksam, dass Fixirmittel, wie Sublimat, das Cocaïn als weisses Pulver ausfällen. S. jedoch § 625 (EISIG).

19. Hydroxylamin. Dieses hat HOFER (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 318) mit gutem Erfolg bei allerlei Thieren angewandt. Man nimmt entweder das Sulfat oder besser das Chlorhydrat. Letzteres ist allerdings im Handel gewöhnlich mit Salzsäure verunreinigt; man löst es daher in Wasser (See- oder Süsswasser, je nach den Objekten) und neutralisirt sorgfältig mit Soda. Die Thiere bringt man in eine

Lösung entweder von $^{1}/_{10}$—$^{1}/_{4}$% auf 10 Minuten bis 1 Stunde (Infusorien, Rotatorien), oder von $^{1}/_{4}$% auf $^{1}/_{4}$—1 Stunde *(Hydra)*, oder von 1% auf $^{1}/_{2}$—2 Stunden *(Hirudo)* oder sogar auf 10—20 Stunden *(Helix* und *Anodonta)* etc.

Hydroxylamin ist ein äusserst stark reduzirendes Mittel. Man darf daher die betäubten Thiere nicht mit Fixirmitteln behandeln, die (wie Osmiumsäure, Chromsäure, Sublimat, Gold- oder Platinchlorid) leicht reduzirbar sind, es sei denn, man habe vorher das Hydroxylamin tüchtig durch Wasser ausgewaschen.

20. Menthol verwendet SORBY (Journ. R. Micr. Soc. London f. 1899 p. 103) zum Lähmen von *Synapta* und Aktinien (genauere Angaben fehlen); nachher Fixirung in 10%igem Formol. — **Acetonchloroform** empfiehlt zum Narkotisiren (und Maceriren, je nach der Stärke der Lösung) von Evertebraten des Süsswassers und Larven von *Rana* RANDOLPH (Z. Anzeiger 23. Bd. 1900 p. 436). — Ueber **Blausäure** s. oben § 15.

21. Mit **Chlormagnesium** hat TULLBERG (Verh. Biol. Ver. Stockholm 4. Bd. 1891 p. 5; Arch. Z. Expér. (2) Tome 10 1892 Notes p. 12) einigen Erfolg gehabt. Für Aktinien setzt man eine 33%ige Lösung ganz langsam dem Wasser mit den Thieren zu, bis das Gefäss 1% des Salzes enthält (also zu 1 Liter Seewasser braucht man 30 ccm Lösung): in $^{1}/_{2}$ Stunde muss das geschehen sein. Nach einer weiteren halben Stunde ist das Thier narkotisirt und kann fixirt werden. Für Land- und Süsswasser-Evertebraten muss man stärkere Lösungen nehmen. — REDENBAUGH (Amer. Natural. Vol. 29 1895 p. 399) ist mit **Magnesiumsulfat** erfolgreich gewesen: entweder gibt er es in fester Form zu dem Seewasser mit den Thieren, bis dieses damit gesättigt ist, oder bringt die Thiere (Anneliden) in eine gesättigte Lösung. DUERDEN (Journ. Inst. Jamaica Vol. 2 1898 p. 449) empfiehlt es für Aktinien, GEROULD (Bull. Mus. Harvard Coll. Vol. 29 1896 p. 125) für Holothurien.

22. Vergiften mit kleinen Dosen irgend eines Fixirmittels hilft auch zuweilen. So giesst Lo BIANCO (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 471), um *Ascidia* und *Rhopalaea* ausgestreckt zu konserviren, von einer 1%igen Chromsäure etwas auf die Oberfläche des Wassers, worin die Thiere sind, und lässt die Säure langsam nach unten diffundiren. Das nimmt 12–24 Stunden in Anspruch. Aehnlich tödtet er *Ciona* mit seiner Chromessigsäure No. 2 (s. § 81). Auch Osmiumsäure oder Pikrinschwefelsäure lässt sich mitunter ebenso verwenden. Ich (LEE) habe Medusen in befriedigender Weise dadurch konserviren sehen, dass Krystalle von Sublimat dem Seewasser zugesetzt wurden.

23. Ersticken lässt sich zuweilen mit gutem Erfolg versuchen. Pulmonaten tödtet man zur Präparation der Organe, indem man sie in ein Gefäss voll ausgekochtes, also luftfreies Wasser bringt und dieses dicht schliesst. Nach 12—24 Stunden sind die Thiere gewöhnlich todt

und ausgestreckt. Gibt man in das Wasser etwas Tabak, so geht es rascher. — Zuweilen genügt es auch, wenn man Wasserthiere einfach in einer relativ sehr kleinen Menge Wassers so lange lässt, bis sie (einerlei, ob durch den Verbrauch des Sauerstoffs oder die Ausscheidung ihrer eigenen Exkrete) darin betäubt werden; so ist es mir (LEE) hie und da mit Holothurien und anderen Echinodermen geglückt, WARD (Amer. Natural. Vol. 25 1891 p. 398) mit Hydroiden, Aktinien und anderen Thieren, und UEXKÜLL (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 463) mit Seeigeln. Waren die Thiere beim Beginn der Narkose nicht gut ausgestreckt gewesen, so bringe man sie auf kurze Zeit in reines Seewasser zurück, und sobald sie sich darin ausgestreckt haben, muss man sie sofort in ein rasch tödtendes Fixirmittel werfen. — Seethiere tödtet man mitunter in befriedigender Weise, indem man sie in Süsswasser bringt. **Warmes Wasser** (§ 11) ist oft gut zum Lähmen und sogar zum Tödten von Seethieren und Süsswasserthieren.

24. Kohlensäure ist von FOL (Z. Anzeiger 5. Jahrg. 1882 p. 698) empfohlen worden. Man soll das Wasser, worin die Thiere liegen, damit sättigen und werde bei den meisten Echinodermen und Cölenteraten Erfolg haben, nicht aber bei Mollusken oder Fischen. Mir (LEE) hat es bei kleinen Anneliden und Hirudineen ganz vortreffliche Dienste geleistet. Man braucht aber durchaus keinen besonderen Gasapparat dazu, sondern kann einfach eine Flasche Sodawasser in das Wasser mit den Thieren schütten. Allerdings werden nur ganz kleine rasch betäubt, z. B. *Stylaria proboscidea* in einigen Sekunden, während eine kleine *Nephelis* 5 Minuten und eine grosse schon ebenso viele Stunden braucht. Die betäubten Thiere erholen sich übrigens rasch wieder, wenn man sie in reines Wasser legt. — UEXKÜLL (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 463) hat Seeigel durch Kohlensäure ungemein rasch gelähmt, ebenso einen kleinen Knochenfisch, während *Scyllium* und Krebse viel länger widerstanden und eine Muschel gar nicht afficirt wurde.

Neuerdings verwendet UEXKÜLL zur Produktion der Kohlensäure die sogenannten Sodor-Flaschen, die er aber mit Seewasser füllt.

25. Wasserstoffhyperoxyd. VOLK (Z. Anzeiger 19. Bd. 1896 p. 294) tödtet Rotatorien mit verdünntem Wasserstoffhyperoxyd (1 oder 2 Tropfen der 3%igen Lösung auf 1 ccm Wasser). Die Thiere sterben, wenn die Verdünnung richtig getroffen ist, ausgestreckt; man bringt sie gleich nach dem Tode in reines Wasser und von da in ein Fixirmittel.

3. Kapitel.

Fixiren und Härten.

26. Nothwendigkeit und Zweck des Fixirens. Oben ist bereits (§ 2) auseinandergesetzt worden, was Fixiren heisst. Hier nun soll auf der absoluten Nothwendigkeit des Fixirens bestanden und diese an einem Beispiel kurz erläutert werden. Legt man ein Stückchen frischer Retina in Humor aqueus, Serum oder eine andere sogenannte indifferente Flüssigkeit oder auch direkt in eins von den Mitteln, die zum Aufbewahren der fertigen Präparate dienen, so wird man bald gewahr, dass die Stäbchen und Zapfen ihr Aussehen wie im Leben nur ganz kurz behalten; schon nach einigen Minuten treten Veränderungen auf: ihre Aussensegmente zerfallen in Scheiben und werden zuletzt ganz unkenntlich, wenn nicht gar völlig zerstört. In derselben kurzen Zeit werden die Nervenfasern varicös und scheinen dicht mit Knötchen besetzt zu sein; auch andere postmortale Veränderungen treten gar schnell ein. Bringt man dagegen die Retina in eine starke Lösung von Osmiumsäure, so sind auch nach 24 Stunden noch die Stäbchen und Zapfen völlig erhalten und die Nervenfasern nicht varicös geworden. Ja, nach dieser Behandlung kann man die Retina in Wasser legen (eine frische Retina würde das absolut nicht vertragen), sogar Tage lang darin lassen; man darf sie färben, ansäuern, härten, einbetten, schneiden und in wässerige oder harzige Media einschliessen, und alles dies, ohne ihr zu schaden.

Einer der Zwecke des Fixirens ist der, die Gewebe in einen solchen Zustand zu versetzen, dass vom Inhalt ihrer Elemente entweder überhaupt so viel wie möglich oder wenigstens das erhalten bleibt, worauf es bei der Untersuchung ankommt. Ferner wünscht man auch da optische Verschiedenheiten hervorzurufen, wo das lebende Gewebe keine aufweist; so z. B. genügt bereits die Fixirung mit Alkohol bei den vielen fast durchsichtigen Seethieren oder ihren Eiern, um an den nun opak gewordenen Objekten allerlei Einzelheiten hervortreten zu lassen, die vorher nur mühsam oder garnicht sichtbar waren.

Apáthy (Mikrotechnik p. 115) unterscheidet zwischen einer allgemeinen und einer differenzirenden Fixirung. Jene erhält alle oder fast alle Bestandtheile des Objektes so, dass sie durch eine allgemeine Färbung im fertigen Präparate deutlich hervortreten, dient also zur Orientirung. Die differenzirende hingegen soll nur bestimmte Elemente ausschliesslich oder doch hauptsächlich tingirbar machen, wobei andere Elemente schlechter wegkommen, ja unter Umständen sogar zerstört werden.

27. Wirkung der Fixirmittel. Die Fixirmittel wirken entweder bloss dadurch, dass sie den Geweben Wasser entziehen — dies thut z. B. der Alkohol — oder dadurch, dass sie mit gewissen Bestandtheilen derselben chemische Verbindungen eingehen. Von diesen sind manche allerdings wenig stabil und werden bereits beim Auswaschen wieder zerlegt — z. B. lässt sich die Pikrinsäure aus den Geweben durch einfaches Behandeln mit Wasser und Alkohol ganz wieder entfernen —, manche hingegen sehr dauerhaft. Im letzteren Falle scheinen meist, wenn nicht immer, die Eiweissstoffe in den Geweben die Reagentien zu reduciren und dann mit ihnen eine feste chemische Verbindung einzugehen; dies gilt z. B. von der Osmiumsäure, der Chromsäure und ihren Salzen, sowie von den Salzen der schweren Metalle, wie Quecksilber, Eisen, Platin, Gold, Silber. Leider ist hierüber chemisch noch Nichts wirklich genau bekannt. Für die Praxis des Histologen steht jedoch so viel fest, dass die letzteren Mittel, da sie sich mit den Geweben mehr oder weniger innig vereinigen, diesen auch, abgesehen vom blossen Fixiren, Eigenschaften ertheilen, die für die weiteren Operationen meist nützlich sind. Nämlich 1) werden durch die Einlagerung anorganischer Bestandtheile die Gewebe hart und widerstehen daher dem späteren Entwässern durch den Alkohol und dem Einbetten in Paraffin oder Celloidin weit besser als sonst; 2) treten gleichzeitig in vielen Fällen manche histologischen Elemente, indem sie die Reagentien anders an sich binden, als die übrigen, für das Auge besser hervor: sie werden optisch differenzirt (s. hierüber auch § 26); 3) bilden einige Chemikalien mit gewissen Stoffen in den Geweben chemische Verbindungen, die das Zustandekommen mancher Färbungen überhaupt erst ermöglichen und in diesem Falle als sogenannte Beizen wirken.

Allerdings können durch die Art der Fixirung auch Nachtheile hervorgerufen werden. So z. B. lassen sich Objekte, die mit Chromsäure (oder ihren Salzen) oder Osmiumsäure fixirt worden sind, mit Karmin und ähnlichen Farbstoffen meist nicht besonders leicht mit-

unter sogar durchaus nicht färben, falls man nicht vorher die Chrom- oder Osmiumverbindung wieder eigens weggeschafft hat; dagegen kommt man mit Hämateïnthonerde meist auch dann noch zum Ziele, und Schnitte durch solche Objekte lassen sich mit Safranin oder Eisenhämatoxylin ganz gut tingiren. Fixirt man aber mit Sublimat oder einem Pikrinsäure-Gemisch, so kann man ganz nach Belieben färben.

Fischer (Fixirung etc.) macht mit Recht von Neuem darauf aufmerksam, dass jedwede Art der Fixirung Kunstprodukte schafft, und zwar streng genommen jedes Fixirmittel ein anderes. Besonderes Gewicht legt er darauf, dass die Eiweisskörper in der Zelle bei der Fixirung ausgefällt werden, noch dazu je nach dem Fixirmittel in verschiedener Weise. Er tritt daher für eine äusserst vorsichtige Deutung der Bilder ein, die man in den fertigen mikroskopischen Präparaten vor sich hat. Da er aber seine Vorstellungen über die Wirkung der Fixirmittel meist durch Versuche in vitro, d. h. an wässerigen Lösungen von Nucleïnsäure, Peptonen, Albuminen, Hämoglobin etc. gewonnen hat, so sind sie im Einzelnen nicht ohne Weiteres auf die Vorgänge bei der Fixirung von lebenden Geweben übertragbar; dasselbe gilt von seiner Anordnung der Fixirmittel in 3 Gruppen je nach ihrem Verhalten gegen einige der genannten Stoffe (Nucleïnsäure, Deuteroalbumose, Serumalbumin). — S. übrigens auch die Kritik von Benda (Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. 1900 p. 173ff.).

Eine ausgedehnte Untersuchung der gebräuchlichsten Fixirmittel hat Tellyesniczky (Arch. Mikr. Anat. 52. Bd. 1898 p. 202—247) angestellt. Er benutzte aber als Objekt ausschliesslich den Hoden von *Salamandra*, und so können auch seine Schlüsse nicht für alle Gewebe gelten. Das Hauptresultat ist die Verwerfung einfacher Flüssigkeiten, da keine von ihnen in den Zellen zugleich das Plasma und den Kern gut konservire; speziell zur Erhaltung des Plasmas eignen sich Osmiumsäure und Kaliumbichromat, und wenn diese nun noch einen Zusatz von Essigsäure bekommen, so werden sie zu den besten Fixirmitteln. In der That empfiehlt T. besonders ein Gemisch von Essigsäure und Kaliumbichromat, ohne aber zu bemerken, dass sich seine Resultate, so weit sie sich auf das Chromsalz beziehen, fast ganz mit denen von Burchardt (1897) decken. S. hierüber Näheres in § 51.

28. Wahl der Fixirmittel. Rathschläge bei der Wahl der Fixirmittel für die verschiedenen Gewebe und Organe der Thiere finden sich in den Kapiteln 23—31 dieses Buches. Hier sollen nur einige allgemeine Punkte erörtert werden.

Ein gutes Fixirmittel muss wenigstens das leisten, dass es die Objekte oder die Elemente von ihnen, auf die es dem Forscher gerade ankommt, in möglichst treuer Beschaffenheit konservirt. Das kann es aber in der Regel nur dann, wenn es rasch in die Objekte eindringt, da diese ja nur selten so dünn sind, dass es sofort mit allen Zellen in Berührung kommen wird. Von grossem Nutzen ist ferner,

dass es alle Elemente (oder wenigstens die gewünschten) optisch differenzirt und dadurch unter Umständen die nachträgliche Färbung überflüssig macht. Leider sind die genannten Eigenschaften kaum in einem der so zahlreichen Mittel vereinigt. Z. B. fixirt Osmiumsäure zwar manche Elemente in den Zellen fast augenblicklich, ist aber selbst in 24 Stunden erst einige Zellschichten tief eingedrungen; sucht man nun diesem Uebelstande durch Zusatz von gut penetrirenden Mitteln (Essigsäure etc.) abzuhelfen, so erreicht man doch nur, dass letztere allein in die Tiefe wandern, während die Osmiumsäure sich nach wie vor mehr auf die Oberfläche beschränkt.

Durch die Praxis hat sich herausgestellt, dass alle wirklich guten Fixirmittel sauer sind; man muss also, wenn sie nicht von selbst sauer reagiren, eine Säure hinzusetzen. FISCHER (Fixirung etc. p. 10) weist darauf hin, dass der Zellinhalt meist alkalisch reagirt und so die Wirkung der gebräuchlichen einfachen Fixirmittel (Osmiumsäure, Platinchlorid etc.) hemmt oder sogar unmöglich macht; daher dient nach ihm die Essigsäure in den Fixirgemischen als „Ansäurer".

Der Anfänger halte sich, wenn es ihm nicht gleich auf ganz specielle Punkte ankommt, an eine angesäuerte Lösung von Sublimat (§ 62); er wird dann viel seltener auf Schwierigkeiten stossen als bei den anderen Mitteln. Auch eine wässerige Lösung von Pikrinsäure (§ 89) ist äusserst bequem in ihrer Anwendung, desgleichen das Formol (§ 107), das meist an sich schon sauer genug ist. Alle diese Mittel erhalten die Form der Zellen und ihrer Kerne gut, sind aber für das Plasma weniger empfehlenswerth. Wird also mehr Gewicht auf die Konservirung des letzteren gelegt, so nehme man das relativ einfache Gemisch von Tellyesniczky (§ 55).

29. Maassregeln für das Fixiren. In erster Linie achte man darauf, dass die Gewebe beim Fixiren unbedingt lebensfrisch sind, sonst fixirt man nur postmortale oder krankhafte Zustände. Ferner sorge man ja für rasches Eindringen des Fixirmittels: man schneide die Objekte in so kleine Stücke, wie das überhaupt für die sonstigen Zwecke angeht; muss man aber Organe oder Thiere in toto konserviren, so mache man vorher wenigstens einige Oeffnungen hinein.

Das Eindringen der Reagentien wird durch Hitze sehr erleichtert. Entweder also erwärmt man die Flüssigkeit vorher und stellt sie dann mit den Objekten in das Wasserbad für das Paraffin, oder man wendet

sie geradezu siedend heiss an, z. B. kochende Sublimatlösung für gewisse Korallen und Hydroiden, oder kochenden Alkohol absolutus für Arthropoden mit sehr dicker Haut. Indessen wird dies immer eine Ausnahme bilden.

Die Menge des Fixirmittels muss die Objekte an Volumen ganz beträchtlich übertreffen. Geschieht das nicht, so kann sich seine Zusammensetzung durch das Wasser oder die löslichen Substanzen in den Geweben bedenklich ändern. So muss z. B. von einem so langsamen und schwachen Mittel wie der gesättigten wässerigen Lösung von Pikrinsäure etwa 100 Mal mehr genommen werden, als das Volumen des Objektes beträgt, dagegen braucht man von sehr energischen Gemischen, wie den Flemmingschen, relativ geringere Mengen.

Braus & Drüner (Jena. Zeit. Naturw. 29. Bd. 1895 p. 435) konserviren Fische durch Injektion in den Bulbus aortae. Zunächst spülen sie von letzterem aus die Adern mit Normalsalzwasser aus, injiziren dann das Fixirmittel, bis „alle sichtbaren Theile die mit der Wirkung des Fixirmittels verbundene Farbenänderung zeigen", verdrängen es wieder durch Wasser, dieses durch Alkohol und legen das Thier in Alkohol. Nach Injektion von Chromgemischen bringt man den Fisch meist sofort in Müllers Gemisch. Für einen grossen Rochen von 1½ m Länge und 1 m Breite braucht man nur 3 Liter Normalsalzwasser, 4 Liter Sublimatessigsäure (5 : 5 : 100), 4 Liter Wasser und 6—8 Liter Alkohol. Die Leber wird ihres vielen Fettes halber nach der Injektion zum grössten Theile entfernt. Die Konservirung ist überall gleichmässig und genügt auch für genaue histologische Untersuchungen. — Mann (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 479) injizirt, um das Gehirn möglichst rasch durch und durch zu fixiren, Säugethieren zuerst nur 20 Sekunden lang warmes (39° C.) Normalsalzwasser (0.75 %), dann gleich hinterher warme Sublimatlösung (nach Heidenhain, § 62a) etwa 5 Minuten lang, präparirt es heraus und legt es auf 12 Stunden in die gleiche Lösung. Auswaschen direkt mit Alkohol von 50 %, der mehrere Male gewechselt wird, dann mit solchem von 80 %, 90 % und 100 %. Die Retina behandelt M. ähnlich, lässt sie aber nur 2 Stunden im Sublimat. — S. auch § 675.

Im Allgemeinen lasse man die Fixirmittel nicht länger einwirken, als bis sie das geleistet haben, was man von ihnen verlangt. Sublimatlösung z. B. macht schon bald die Objekte brüchig. Einzelne Forscher lassen allerdings Flemmings Gemisch oft mehrere Wochen lang wirken, und dies scheint fast zur Erzielung gewisser optischer Differenzirungen nöthig zu sein.

Fast stets muss man nach dem Fixiren den Ueberschuss des Fixirmittels, der rein mechanisch in den Hohlräumen des Gewebes zurückgehalten wird, sorgfältig auswaschen. Denn wohl nur bei Fixirung in starkem Alkohol ist dies nicht nöthig, obwohl selbst da

gut. Auch aus Formol, Pikrinsäure oder Essigsäure kann man zur Noth die Objekte direkt in die Färbgemische übertragen, wenn man diese dazu richtig auswählt; aber besser ist auch in diesen Fällen die Entfernung des Fixirmittels. Also mache man es sich zur Maxime, stets auszuwaschen, und verwende dazu ja die richtige Flüssigkeit. Oft ist es nämlich gar nicht einerlei, ob man Alkohol oder Wasser nimmt: zuweilen macht letzteres die ganze Fixation zu nichte (so bei Pikrinsäure), zuweilen fällt ersterer Substanzen aus, die die Präparate beschädigen können. Näheres hierüber bei den einzelnen Fixirmitteln!

Die Waschflüssigkeit muss reichlich sein. Man wechsele sie, falls sie trübe wird. Auch das Waschen erleichtert Wärme oft; z. B. löst Alkohol von 40° C. etwa doppelt so viel Pikrinsäure wie bei gewöhnlicher Temperatur (Fol).

30. Fixiren von Seethieren. Da bei diesen die Körpersäfte sehr viel Salze enthalten (s. § 384) und bei den Wirbellosen mit dem Seewasser geradezu isotonisch sind, so ergeben sich daraus einige Besonderheiten für die Fixirung.

Man muss von den ungeöffnet zu fixirenden Seethieren das Wasser so gut wie möglich ablaufen lassen, wenn man sie in Alkohol oder sonst ein Fixirmittel bringt, das die Seesalze niederschlagen kann. Thut man das nicht, so bilden diese Salze auf den Objekten eine Kruste, die den Reagentien den Weg nach innen versperrt, sodass Maceration eintreten kann und später auch die Tinktion schlechter von Statten geht. Daher sollten in der Regel die Fixirmittel so gewählt werden, dass sie die Seesalze in Lösung halten und schliesslich ganz wegschaffen. Diese Bedingung erfüllt z. B. die Pikrinsalpetersäure (§ 93). Nimmt man direkt Alkohol, so muss er mit Salzsäure oder sonst einer brauchbaren Säure angesäuert werden. Andererseits giebt es auch Fixirmittel, die nur dann auf Seethiere gut wirken, wenn sie in Seewasser gelöst oder damit verdünnt werden; dies gilt vom Formol, unter Umständen von der Osmiumsäure, Pikrinsäure und vom Sublimat. Dann muss man hinterher durch sorgfältiges Auswaschen mit schwachem Alkohol die Seesalze zu entfernen suchen, bevor sie sich in und auf den Thieren so fest niederschlagen, dass man sie kaum wieder los wird; oder man hilft sich, indem man die Objekte in Glycerin einschliesst.

31. Härten. Wie oben in § 2 auseinandergesetzt, ist das Härten der Objekte vom Fixiren wohl zu unterscheiden. Man versteht nun

unter Härten die Operation, die das Objekt gegen die etwaigen späteren Schädigungen beim Schneiden oder beim Einschliessen in Harz etc. resistent machen soll, und vollzieht sie gewöhnlich durch vorsichtige Uebertragung der regelrecht fixirten, aber noch ziemlich weichen Objekte in immer stärkeren Alkohol. Wenn das Fixirmittel bereits selber zur Genüge härtet, so dient der Alkohol nur zur Entwässerung, indessen ist das seltener der Fall. Aber es lassen sich auch manche weiche Gewebe einfach durch Einlegen in die sogenannten Härtgemische direkt, d. h. ohne Einbettung in Paraffin etc., schneidbar machen; ja, man bezeichnete sogar früher stets und auch jetzt noch oft ausschliesslich diese Procedur als Härten. Jedoch wird sie nur in speciellen Fällen ausgeübt, und man sieht bei ihr ganz davon ab, ob das Gewebe noch lebendig oder erst post mortem oder bereits vorher fixirt in das Härtgemisch eingelegt wird.

In einer früheren Periode der Mikrotechnik kam es beim Härten der Objekte meist nur auf die Erhaltung der äusseren Form und der gröberen Bestandtheile an, und so genügte eventuell sorgfältiges Austrocknen bis zur richtigen Konsistenz, Kochen in Wasser, Einlegen in Essig oder auch in Flüssigkeiten, die so langsam in die Objekte eindrangen, dass diese innen bereits etwas macerirt waren, bevor das Härtmittel zu ihnen gelangte. Diese relativ rohen Mittel sind aber heute zu Tage wohl gar nicht mehr im Gebrauch, da man in den Schnitten viel mehr zu sehen verlangt als damals.

32. Maassregeln für das Härten. Man nehme im Allgemeinen relativ viel Flüssigkeit und wechsele sie oft. Die richtige Menge muss man für jedes Objekt erst ausprobiren. Ist die Flüssigkeit nicht reichlich genug, so ändert sie sich zweifellos schon bald bedenklich dadurch, dass aus den Objekten die löslichen Substanzen hineindiffundiren, und dann kommt es am Ende leicht statt zur Härtung zur Maceration. Sobald ferner in Folge der Diffusion die Flüssigkeit soviel Colloide und Kristalloide aus den Objekten aufgenommen hat, dass sie davon ebensoviel enthält wie die Objekte selber, so ist das osmotische Gleichgewicht erreicht, und die Diffusion hört auf. Das heisst also: die Flüssigkeit dringt nicht weiter ein, und daraus ergiebt sich im Innern Maceration. Auf der anderen Seite scheint eine geringe Menge von Colloiden im Härtgemisch der gewünschten Reaktion förderlich zu werden, insofern sie die Gewebe vor dem Brüchigwerden bewahrt und ihnen so eine bessere Konsistenz verleiht; hieraus würde folgen, dass unter Umständen auch das Innehalten einer gewissen maximalen Proportion im Volumen des Härtgemisches zu dem des Objekts nützlich ist.

Man verwendet, besonders beim Härten s. str., d. h. in besonderen Härtgemischen, am besten hohe Cylindergläser und hängt die Objekte mit einem Faden oben in der Flüssigkeit auf. So hat die Diffusion möglichst freies Spiel, und die etwaigen Präzipitate fallen harmlos zu Boden.

In solchen Fällen härtet man im Anfang stets mit einer schwachen Lösung und verstärkt sie allmählich erst dann, wenn die Gewebe schon konsistent genug geworden sind, um auch ein energisches Reagens zu vertragen. Sobald aber die Objekte die gewünschte Härte erlangt haben, müssen sie gleich herausgenommen werden.

Handelt es sich um die Härtung fixirter, aber im Fixirmittel noch relativ weich gebliebener Gewebe durch Alkohol (also nach Fixirung mit Essigsäure, wässeriger Lösung von Pikrinsäure etc.), so muss man beim Uebertragen in den Alkohol und beim Wechseln desselben recht behutsam sein, damit es nicht zu Schrumpfungen komme. Wenn dagegen die Objekte im Fixirmittel (z. B. Flemmings Gemisch) bereits hart geworden sind, so ist hinterher in der Regel keine so grosse Vorsicht nöthig.

4. Kapitel.

Fixirmittel und Härtmittel.

Aus praktischen Gründen ist der Stoff in diesem Kapitel nicht nach den Leistungen der Fixirmittel und Härtmittel, sondern nach deren Zusammensetzung angeordnet: zunächst werden die anorganischen Säuren (Osmiumsäure, Chromsäure etc.) und ihre Salze, dann die organischen Säuren (Essigsäure etc.) und ihre Salze sowie andere Substanzen, wie Alkohol, Formol etc., besprochen. Da aber die Fixirgemische, besonders die komplizirteren, diese Eintheilung nicht respektiren, so sind einige Inkonsequenzen nicht zu vermeiden gewesen und häufige Verweisungen nöthig geworden. Die Trennung der Fixirmittel von den Härtmitteln im engeren Sinne, wie sie in der 1. Auflage bestand, ist als unpraktisch aufgegeben.

33. Osmiumsäure. Das Osmiumtetroxyd (OsO_4) wird gewöhnlich als Osmiumsäure oder Ueberosmiumsänre bezeichnet, obwohl es keine sauren Eigenschaften besitzt. Es lässt sich nur äusserst schwer lange gebrauchfähig aufbewahren, denn es ist ungemein flüchtig und wird in wässeriger Lösung bei Gegenwart von Spuren organischer Substanz mit grosser Schnelligkeit theilweise reduzirt. Gewöhnlich glaubt man, das Licht allein bewirke dies, aber das ist nicht richtig: man kann die wässerige Lösung dem Licht ungestraft aussetzen, falls nur der Zutritt von Staub absolut verhindert wird.

Die Osmiumsäure wurde von M. Schultze 1864 in die Mikrotechnik eingeführt, dann aber besonders durch F. E. Schulze (1871) in ihren Leistungen genauer bekannt. S. hierüber Schultze & Rudneff (Arch. Mikr. Anat. 1. Bd. 1865 p. 299) und Merk (Sitzungsb. Akad. Wien 108. Bd. 3. Abth. 1899 p. 358).

Die Autoren legen viel Gewicht darauf, dass die Dämpfe der Osmiumsäure die Schleimhäute stark reizen. Man bekomme ungemein leicht einen ernsten Katarrh, Reizung der Bronchien, Laryngealkatarrh, Conjunctivitis etc. Ich (Lee) habe das nie an mir verspürt, aber bei manchen Personen ist es zweifellos der Fall, und dann sollten sie sehr vorsichtig mit der Osmiumsäure umgehen.

34. Aufbewahrung der Lösungen von Osmiumsäure. In der Praxis ist es kaum möglich, die Lösungen absolut vor dem Hineinfallen von Staub zu schützen und so vor der Reduktion zu bewahren. Da sich aber die Lösungen bei Gegenwart von Chromsäure halten, so mag man

einfach (nach LEE) den Hauptvorrath an Osmiumsäure als 2 %ige Lösung in 1 %iger Chromsäurelösung aufbewahren und ihn in dieser Gestalt nicht nur zum Fixiren mit Osmiumdämpfen, sondern auch zur Bereitung der gebräuchlichsten Gemische, also deren von Flemming und von Hermann, benutzen. (Wer übrigens viel mit Dämpfen fixirt, mag sich dazu direkt der festen Säure bedienen).

Nach CORI (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1890 p. 442) halten sich die Lösungen in destillirtem Wasser konstant, wenn man ihnen so viel Kaliumhypermanganat zusetzt, dass sie hellrosa werden. Sobald sie sich entfärben, muss man wieder ein wenig von diesem Salz zugeben, sodass sie beständig rosa bleiben. — Neuerdings werden im 1. Wiener Zool. Institute, wie mir (MAYER) TH. PINTNER mittheilt, die Lösungen durch Hinzufügung einer ganz kleinen Menge Sublimat zum destillirten Wasser beim Lösen der Osmiumsäure haltbar gemacht. Aus eigener Erfahrung kann ich Aehnliches nur empfehlen: 100 ccm einer 1 %igen Lösung, mit 10 Tropfen einer 5 %igen Sublimatlösung vermischt, stehen im hellsten Lichte bereits seit 1½ Jahren unverändert (nur leicht gelb geworden) da, während eine andere Lösung ohne Sublimat einen starken Absatz von reduzirter Osmiumsäure zeigt.

Nach BUSCH (Neur. Centralbl. 17. Jahrg. 1898 p. 476; Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1899 p. 373) hindert Natriumjodat ($NaJO_3$) die rasche Zersetzung der Lösungen. B. nimmt davon die dreifache Menge der Osmiumsäure.

35. Regeneration reduzirter Lösungen. BRISTOL (Amer. Natural. Vol. 27 1893 p. 175) stellt reduzirte Lösungen durch Wasserstoffhyperoxyd wieder her; am besten gehe dies im Sonnenlicht. Zur Regeneration von 100 ccm einer 1 %igen Lösung sollen 10—20 Tropfen einer frischen Lösung von Wasserstoffhyperoxyd (wie stark diese ist, wird aber nicht gesagt) genügen.

Nach KOLOSSOW (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 40) lassen sich halb reduzirte Lösungen, solang sie noch nach Osmiumsäure riechen, durch Zusatz von etwas pulverisirtem Kalialaun wieder klar und brauchbar machen. — In der That setzt sich dann nach meinen (MAYER) Versuchen das reduzirte Metall, das sonst in der Flüssigkeit lange schweben bleibt und sich nicht abfiltriren lässt, rasch zu Boden; ein Zusatz von Kochsalz besorgt das aber auch, und natürlich kann nicht davon die Rede sein, dass die Lösung wieder ihre alte Stärke erreiche.

36. Fixiren mit den Dämpfen von Osmiumsäure. Osmiumsäure wird oft als Dampf benutzt, und zwar mit Vortheil meist dann, wenn sich ihm die Gewebe direkt aussetzen lassen. Man spannt diese

mit Nadeln auf einem Kork aus, der gut in eine weithalsige Flasche mit ein wenig fester Osmiumsäure (oder auch etwas 1 %iger Lösung) auf dem Boden passt. Sehr kleine Objekte, wie isolirte Zellen, werden einfach auf einen Objektträger gebracht, den man dann umgedreht auf die Mündung der Flasche legt. So bleiben sie liegen, bis sie sich bräunen; isolirte Zellen sind meist in 1/2 Minute gut fixirt, dagegen erfordern dichtere Objekte, z. B. die Retina, um ordentlich durchdrungen zu werden, mehrere Stunden. Gut ist es ferner, die Objekte nachher vor dem Färben mit Wasser ganz leicht abzuwaschen. Zum Färben ist Methylgrün empfehlenswerth, wenn man die Objekte gleich weiter in einem wässerigen Medium studiren will, hingegen für Dauerpräparate Alaunkarmin, Pikrokarmin oder Hämatoxylingemische, ferner Safranin und andere kernfärbende Theerfarbstoffe.

Beim Studium der Spermatogenese ist es nach Gilson (La Cellule Tome 1 1885 p. 96) unter Umständen nützlich, mit einem frischen Gemisch von Osmiumsäure und Essigsäure zu räuchern. — Stuhlmann (Z. Anzeiger 8. Jahrg. 1884 p. 643) behandelt die aufgeklebten Schnittreihen mit Osmiumdämpfen, um optische Differenzirungen zu erhalten. — Einen Apparat zum Räuchern mit Osmiumsäure beschreibt Andrews (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1898 p. 448).

Das Fixiren mit den Dämpfen von Osmiumsäure ist, wo es überhaupt angeht, deswegen so gut, weil die Säure besser in dieser Form als in wässeriger Lösung eindringt und eine gleichmässigere Wirkung ausübt, ferner aber auch, weil man so vor dem lästigen Auswaschen herkommt, das ja sonst nöthig wird. Feine Elemente werden in vielen Fällen besser konservirt, da das Auftreten von Veränderungen durch Osmose beim Räuchern ja ausgeschlossen ist.

37. Fixiren mit Lösungen von Osmiumsäure. Gegenwärtig benutzt man reine Osmiumsäure in Lösung nur noch ziemlich selten, sondern mischt sie gewöhnlich anderen Mitteln, z. B. der Chromsäure, bei. In Wasser gelöst wird sie in Stärken von 1/20 – 2 % gebraucht; auch die Länge der Zeit, die man sie einwirken lässt, schwankt je nach den Objekten und dem Erfolg, den man erzielen will, ungemein (von wenigen Sekunden bis zu Wochen).

Verwendet man Lösungen in destillirtem Wasser ohne weiteren Zusatz, so muss man sie nach Flemming (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 181) im Dunkeln auf die Gewebe einwirken lassen; dagegen ist das nicht nöthig mit den Gemischen von Flemming oder Hermann. Soll die Einwirkung lange dauern, so muss man mit Rücksicht auf die grosse Flüchtigkeit der Osmiumsäure gut verschliessbare Gefässe anwenden. Für Seethiere (oder Seepflanzen) empfiehlt sich oft die

Lösung der Osmiumsäure in Seewasser oder wenigstens ein Zusatz von letzterem zur Lösung in destillirtem Wasser.

Da die Osmiumsäure nur ganz wenig in die Tiefe dringt, so muss man eventuell die Objekte vorher in kleine Stücke schneiden. Busch (Neur. Centralbl. 17. Jahrg. 1898 p. 476; Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1899 p. 373) empfiehlt aus dem gleichen Grunde statt der reinen Osmiumsäure ein Gemisch von dieser und Natriumjodat (Osm. 1, Natriumjodat 3, Wasser 300), da letzteres die Reduktion der Osmiumsäure in den Geweben verzögere, und lässt die Objekte (1 cm dicke Stücke des Nervensystems) 5—7 Tage darin.

Oft kann man vortheilhaft den Lösungen unmittelbar vor dem Gebrauch $^1/_2$—1 % Essig- oder Ameisensäure zusetzen. Fol (Lehrbuch p. 99) verwendet ein Gemisch von Osmiumsäure 1, Essigsäure 10 und Wasser 1000 Theilen. — Unna (Monatsh. Prakt. Derm. 26. Bd. 1898 p. 602) empfiehlt, der 1 %igen Lösung von Osmiumsäure 1 % Alaun zuzufügen.

Kolossow (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 51) giebt als ein Gemisch, das sehr leicht in die Gewebe eindringe, eine $^1/_2$ %ige Lösung von Osmiumsäure in einer 2- oder 3 %igen von Urannitrat oder Uranacetat an. Später (ibid. 9. Bd. 1892 p. 39) rühmt er aus dem gleichen Grunde ein Gemisch von 50 ccm Alkohol absol., 50 ccm destill. Wasser, 2 ccm konz. Salpetersäure und 1—2 g Osmiumsäure; es halte sich an einem kühlen Orte unbegrenzt lange. — S. übrigens die rationellere Vorschrift von Nicolas (§ 48). - Die Gemische von Osmiumsäure und Alkohol allein (Ranvier, Vignal) zersetzen sich jedenfalls so rasch, dass ihre Verwendung nicht anzurathen ist.

Mann (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 481) empfiehlt zum Fixiren von Nervencentren gleiche Volumina von 1 %iger Osmiumsäure und gesättigter Lösung von Sublimat in Normalsalzwasser (0.75 %), die aber erst unmittelbar vor dem Gebrauch zu mischen sind; so werde die Quellung der Gewebe verhindert und später die Färbung erleichtert.

Ueber die bekanntesten Gemische von Osmiumsäure mit anderen Reagentien, nämlich die von Flemming und das von Hermann, s. § 45, 46 und 72.

38. Nachbehandlung nach der Fixirung mit Lösungen von Osmiumsäure. Den Ueberschuss an Osmiumsäure muss man vor Allem auswaschen, z. B. mit Wasser. Indessen trotz der grössten Sorgfalt dabei bleibt doch häufig etwas Säure in den Geweben zurück und schwärzt diese mit der Zeit zu sehr, verhindert oder erschwert auch die Färbung. Man mag daher die Objecte direkt aus der Osmiumsäure, wie Flemming empfiehlt, auf 24 Stunden in eine Lösung von Kalium-

bichromat (z. B. die Müllersche oder Erlickische), oder in $^1/_2$%ige Chromsäure oder in Merkels Gemisch bringen. Die Behandlung mit Bichromaten gewährt den Vortheil, die Färbung mit Karmin- oder Hämatoxylingemischen sehr zu erleichtern. MAX SCHULTZE empfahl Auswaschen und Aufbewahren der Objekte in Lösung von Kaliumacetat, aber die Vorzüge dieser Methode sind wohl illusorisch. Am besten ist es jedenfalls, die Präparate vor dem Färben ordentlich zu bleichen. Das lässt sich z. B. mit Wasserstoffhyperoxyd thun, das die reduzirte Osmiumsäure wieder regenerirt, falls man es sich in guter Qualität beschaffen kann. Nach OVERTON (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 11) bleicht ein Gemisch von 1 Theil käuflichem Wasserstoffhypéroxyd und 10—25 Theilen 70—80%igem Alkohol bereits in einigen Minuten. (Das käufliche ist leicht mit H Cl angesäuert und hält sich im Dunkeln gut, aber mit Alkohol muss man es jedesmal frisch mischen.) Nach BRISTÖL (Amer. Natural. Vol. 27 1893 p. 176) wirkt das Wasserstoffhyperoxyd besser in der Sonne. Aber nicht viel komplizirter und wenigstens ebenso sicher im Erfolg ist die älteste dieser Methoden, nämlich die von MAYER (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 8) angegebene mit Kaliumchlorat und Salzsäure (Genaueres s. im § 568). — BINET (Journ. Anat. Phys. Paris Tome 30 1894 p. 470) hat mit Erfolg bei Schnitten Kaliumhypermanganat angewandt.

MÖNCKEBERG & BETHE (Arch. Mikr. Anat. 54. Bd. 1899 p. 140) suchen die Färbbarkeit durch Reduzirung des von der Osmiumsäure oxydirten Gewebes (markhaltige Nervenfasern) wieder herzustellen und legen es deshalb auf 6—12 Stunden in eine 2%ige Lösung von Natriumbisulfit, der unmittelbar vorher auf je 10 ccm 2–4 Tropfen Salzsäure zugesetzt worden sind. — Ich (MAYER) habe diese Methode an mehreren, allerdings anderen Objekten (osmirtem Fett, Schnitten durch *Ciona* und *Batrachoseps*) geprüft und gefunden, dass sie nicht allgemein anwendbar ist und besonders die Färbbarkeit der Zellkerne nicht regenerirt.

ALTMANN (Elementarorganismen Leipzig 1890 p. 33 und 35) empfiehlt eine 2%ige Lösung von Goldchlorid zum „eleganten und sicheren" Fortschaffen des Osmiums aus den Geweben. — Ich (MAYER) habe auf mündliche Veranlassung von APÁTHY, der für Schnittserien ebenfalls hierzu Goldchlorid (nachher Uebertragen in Jodtinctur) verwendet, letztere Methode auch versucht, bin aber nicht sonderlich davon befriedigt.

FOL (Lehrbuch p. 174) benutzt, um die Schwärzung zu verhindern, BEALE's Karmin oder Boraxkarmin und lässt zum Bleichen der zu schwarz gewordenen Objekte besser als Javellelauge oder Wasserstoffhyperoxyd eine schwache wässerige Auflösung des rothen Blutlaugensalzes sein. Auch das gelbe könne, obwohl mit grösserer Vorsicht, angewendet werden. Ich (MAYER) habe allerdings mit

dem rothen leidliche Resultate erzielt, mit dem gelben hingegen nicht. und muss ferner einwenden, dass das rothe nur in wässeriger Lösung, nicht aber in Alkohol wirkt, was mir gegenüber meiner Bleichmethode (§ 568) ein Nachtheil zu sein scheint. Wasserstoffhyperoxyd (§ 570) als leicht zersetzliche Flüssigkeit ist ebenfalls nicht besonders zu empfehlen, dagegen habe ich Magnesiumhyperoxyd, aus dem man durch eine Säure den wirksamen Sauerstoff in Freiheit setzt, als ein zwar langsam, aber sehr schonend wirksames Mittel befunden. Nach dem Vorgange von Cox (unten § 693) habe ich auch die Oxydation durch Bergamottöl versucht: in der That wurden Objekte, die zu lange in Hermanns Gemisch gelegen hatten, nach 8 tägigem Verweilen fast ganz entfärbt, aber in hartnäckigeren Fällen, wo meine Bleichmethode noch rasch half, versagte jenes Oel völlig. Dabei scheint auch die Qualität des Oeles und sein Alter mitzuspielen.

Die oben § 36 nach der Räucherung mit Osmiumsäure empfohlenen Färbmittel sind auch hier nützlich, wirken indessen, je nachdem sie auf die ungebleichten oder die gebleichten Objekte angewandt werden, sehr verschieden. S. auch unten § 832 (Duboscq).

39. Wirkung der Osmiumsäure. Im Allgemeinen erhält Osmiumsäure, namentlich als Dampf, die Form der Zellen getreuer als irgend ein anderes Reagens. Indessen sind doch einige Nachtheile ausser den schon oben im § 27 genannten damit verknüpft. Das Vermögen, in die Tiefe zu dringen, ist sehr gering; sind daher die Objekte nicht ganz klein, so werden die äusseren Schichten überfixirt, bevor noch die Säure zu den inneren gelangt ist. Die überfixirten Zellen nun sehen eigenthümlich homogen oder glasig aus, da alle ihre Bestandtheile in Folge der Coagulation das Licht so stark brechen, dass man wenig oder gar keine Einzelheiten darin wahrnimmt. Auch färben sie sich nur sehr schlecht oder gar nicht.

Die erwähnte Gefahr wird nun zwar verringert, wenn man die Osmiumsäure in Verbindung mit anderen Mitteln braucht, wie z. B. mit Chromsäure, aber keineswegs ganz aufgehoben; auch die Gemische von Flemming, besonders das starke, schwärzen bei unvorsichtiger Anwendung die äusseren Zellschichten leicht. Allerdings hat dies für gewöhnliche histologische Arbeiten nichts zu bedeuten, aber handelt es sich um feinere Zellstrukturen, so sollte man sich in erster Linie an die Zellen halten, die 4 oder 5 Schichten tiefer liegen und daher gewöhnlich in der richtigen Weise fixirt sind.

Nach Fischer (Fixirung etc. p. 12 u. 25) ist die Osmiumsäure ein sehr schwaches, unvollständiges Fällungsmittel, und in den Schnitten hat man dann neben der Fixirung durch sie die kräftige durch Alkohol vor sich. Dies ist besonders bei alkalischen oder neutralen Geweben der Fall, während in sauren

eine Gerinnung möglich ist, und so kann man mit der Osmiumsäure geradezu die chemische Reaktion einer Zelle oder eines Kernes nachweisen. Daher wirkt der Zusatz von Essigsäure vortheilhaft. — TELLYESNICZKY hingegen stellt (Arch. Mikr. Anat. 52. Bd. 1898 p. 228) die Osmiumsäure sehr hoch, da sie das Plasma besonders gut erhalte, sodass es den ihm zukommenden Raum in der Zelle auch noch in den Präparaten ausfülle. Dadurch erkläre sich auch die homogene Beschaffenheit der Zellen. — MÖNCKEBERG & BETHE (Arch. Mikr. Anat. 54. Bd. 1899 p. 136) lassen die Osmiumsäure lediglich durch Oxydation wirken; da nun die Gerinnung ausgeschlossen ist, so entstehen im Plasma auch keine Lücken, und daher dringt jene schlecht ein, erhält aber dafür in den Zellen die Kerne besonders gut, denn gerade ihre homogene Beschaffenheit entspricht dem Leben.

Dass sich mit Osmiumsäure auch viele andere Substanzen als nur Fett schwärzen oder bräunen, wussten bereits SCHULTZE & RUDNEFF, aber mancher spätere Autor hat das nicht genug beachtet. Wirkliches Fett lässt sich auch nach der Osmirung durch fettlösende Mittel aus den Präparaten entfernen, wenn es für die Erforschung der übrigen Elemente irgendwie hinderlich werden sollte. Andererseits wird durchaus nicht jede Art von Fett schwarz. (Näheres in § 772.)

40. Chromsäure. Das Chromtrioxyd (CrO_3) findet sich im Handel als rothe Kristalle, die sich in Wasser leicht unter Bildung von Chromsäurehydrat (H_2CrO_4) lösen. Die Kristalle sind leicht zerfliesslich, und man hält daher am besten die Säure in 1 %iger Lösung vorräthig. Auch dürfen die Kristalle nicht mit organischen Körpern in Berührung kommen, da sie sonst leicht zu Chromoxyd (Cr_2O_3) reducirt werden.

Die Chromsäure wurde von HANNOVER (Arch. Anat. Phys. 1840 p. 549) in die Mikrotechnik eingeführt.

Man gebraucht die Chromsäure in wässeriger, zuweilen auch in alkoholischer (§ 41) Lösung. Die wässerige ist am besten $^1/_{10}$—1 % stark, und man legt die Objekte nur auf einige Stunden hinein. Nervengewebe kommt auf einige Stunden in eine Lösung von nur $^1/_{50}$—$^1/_8$ %. Starke Lösungen (5 %) sollte man nur wenige Sekunden einwirken lassen.

Allgemein wird angegeben, man müsse die Objekte nachher in Wasser auswaschen, und zwar recht lange in fliessendem, bevor man sie in Alkohol oder ein Färbemittel überführe. Dies hat darin seinen Grund, dass sich beim direkten Uebertragen in den Alkohol ein Präzipitat auf und in den Objekten niederschlägt, was natürlich vermieden werden muss. Indessen hat VIRCHOW (Arch. Mikr. Anat. 24. Bd. 1885 p. 117) gefunden, dass es sich im Dunkeln nicht bildet: zwar wird der Alkohol genau so gelb wie im Licht (und

sollte daher auch oft gewechselt werden), aber kein Niederschlag tritt auf. Verfährt man also nach dieser Vorschrift, so ist das vorherige Waschen mit Wasser unnöthig oder kann wenigstens stark abgekürzt werden. Ferner lassen sich nach MAYER (1. Auflage dieses Buches p. 28) die mit Alkohol im Dunkeln behandelten Objekte, die in der Regel ziemlich braun oder grün geworden sind, entweder in toto oder nach dem Schneiden wieder so weit entfärben, dass sie ohne Schwierigkeiten Farbstoffe annehmen. Die Schnitte behandelt man nämlich einfach mit dem gebräuchlichen salzsauren Alkohol: sie werden in kurzer Zeit fast weiss und färben sich dann nach der Entsäuerung ganz vorzüglich auch mit den gewöhnlichen Färbmitteln. Will man jedoch in toto entfärben, so bringt man die Stücke entweder in verdünnte Schwefelsäure (1 Vol. auf 20 Vol. Wasser) oder Salpetersäure (1:10); sie werden in längstens einigen Stunden hell graugrün und färben sich nach Entfernung der Säure gut durch. Zwar sind sie natürlich, da sie an anorganischer Substanz verloren haben, nicht mehr so hart wie früher, lassen sich aber unter 90 $^0/_0$igem Alkohol aus freier Hand mit dem Rasirmesser doch in dünne Schnitte zerlegen und haben histologisch wohl kaum gelitten.

Wie ich nachträglich finde, hat diese Art der Entchromung bereits EDINGER (Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 126) angegeben: Salpetersäure 1:20 5 Minuten lang. — UNNA (Arch. Mikr. Anat. 30. Bd. 1887 p. 47) lässt in den Geweben das Chrom als chromsaures Chromoxyd vorhanden sein und entfernt es durch Behandlung mit Wasserstoffhyperoxyd; OVERTON (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 10) verwendet dazu (bei Algen) eine schwache wässerige Lösung von schwefliger Säure, die es zu Chromsulfat auflöst, GILSON (nach direkter Mittheilung an LEE) die schweflige Säure in alkoholischer Lösung.

Nach FISCHER (Fixirung etc. p. 21) wird die Wirkung der Chromsäure vielleicht durch die geringen Mengen Schwefelsäure, die sie im Handel enthält, noch erhöht.

Die Chromsäure dringt nicht leicht in die Tiefe und wird deshalb, aber auch aus anderen Gründen, zum Fixiren nur noch selten allein verwandt, spielt dagegen eine sehr wichtige Rolle in vielen Gemischen, von denen die Flemmingschen (§§ 45 u. 46) die wichtigsten sind.

Zum gründlichen Härten braucht man die Chromsäure gewöhnlich in der Stärke von $^1/_5$ bis $^1/_2$ $^0/_0$ einige Tage bis einige Wochen lang, je nach Grösse und Art des Objektes. Schleimhäute z. B. sind in einigen Tagen hart genug, das Gehirn dagegen erfordert Wochen. Man muss aber grosse Mengen der Lösung nehmen; wenigstens 200 ccm auf ein Stück von etwa 1 ccm (RANVIER).

Zur Erzielung von wirklich guten Resultaten sollte man keine grösseren Stücke härten wollen als etwa von 15 ccm. Das Rückenmark eines Menschen erfordert 2 Liter Lösung, und diese muss nach einigen Tagen gewechselt werden, auch dauert die Härtung 6—8 Wochen.

Man beginne mit einer schwachen Lösung und verstärke sie erst nach einiger Zeit. Sobald die Stücke die richtige Härte erreicht haben, nehme man sie heraus, sonst werden sie brüchig. Man mag sie dann bis zur weiteren Verwendung in Alkohol (von 95%) aufheben, jedoch wäscht man sie am besten vorher 24—48 Stunden lang in Wasser aus. Man setzt auch wohl der Härtlösung etwas Glycerin zu: die Objekte scheinen dann weniger brüchig zu werden und weniger zu schrumpfen.

41. Chromsäure in alkoholischer Lösung. Da sich Chromsäure und Alkohol schon nach ganz kurzer Zeit gegenseitig zersetzen, so kann in derartigen Gemischen, falls sie nicht unmittelbar vor dem Gebrauch angefertigt werden, die Chromsäure nicht mehr als solche wirken. Trotzdem seien hier einige von ihren Erfindern und sogar von anderen Autoren sehr gerühmte Vorschriften der Vollständigkeit halber aufgeführt. Klein (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 18 1878 p. 315) hat bei seinen Untersuchungen über Zellen und Kerne ein Gemisch von 2 Theilen einer 1/6 %igen Chromsäurelösung und 1 Theil Alkohol von 90% viel benutzt. Zum Färben diente ihm ein Hämateïngemisch. — Lo Bianco (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 443) verwendet zum Fixiren einiger Seethiere ein Gemisch von gleichen Theilen 1%iger Chromsäure und Alkohol von 70%. — Pritchard (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 13 1873 p. 427): Chromsäure 1, Wasser 20, 84%iger Alkohol 180 Theile. Zur Härtung der Retina, Cochlea etc. sei dies Gemisch besonders geeignet.

Zu diesen irrationellen Mixturen gehört auch das Gemisch von Perényi (Z. Anzeiger 5. Jahrg. 1882 p. 459), das aus 4 Theilen 10%iger Salpetersäure, 3 Theilen Alkohol (Stärke nicht angegeben, wohl 90%) und 3 Theilen 1/2%iger Chromsäurelösung angefertigt und schon bald hellviolett wird. Es besteht dann, wie Mayer in der 1. Auflage dieses Buches hervorhebt, im Wesentlichen nur aus einem Alkohol von höchstens 30% mit etwa 4% Salpetersäure. Macht man sich nun unter Ersatz der Chromsäurelösung durch Wasser ein analoges Gemisch, so fixirt es nach Mayer's Erfahrungen ganz so wie das Perényische, d. h. wie ein so schwacher saurer Alkohol überhaupt kann, und das ist eher schlecht als gut. Die Objekte schrumpfen darin allerdings nicht; eher quellen sie auf, mitunter recht beträchtlich. In der That fehlt es denn auch nicht an Stimmen, die es für die Konservirung von Eiern durchaus verwerfen. So ist z. B. Cholodkovsky bei seinen Untersuchungen über die Embryogenese von *Blatta* durch Anwendung des Gemisches von Perényi zu seltsamen Resultaten gekommen, und dies hat nicht nur Mayer im Z. Jahresbericht angedeutet (f. 1891 Arthropoda p. 61), sondern es ist auch später von

WHEELER und HEYMONS (ibid. f. 1893 p. 71 und f. 1895 p. 61) ausdrücklich auf diese Fehlerquelle hingewiesen worden. Wenn also TELLYESNICZKY (Arch. Mikr. Anat. 52. Bd. 1898 p. 237) die „aus unserer Anstalt herrührende Flüssigkeit besonders vortheilhaft zur Fixirung der Eier von Amphibien“ sein lässt, so ist das nicht ohne Weiteres zuzugeben; aber auch er lässt die günstige Wirkung auf der Salpetersäure beruhen. Jedenfalls kommt man einfacher zum Ziel, wenn man schlechtweg sauren Alkohol nimmt, wie ihn MAYER bereits 1880 (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. p. 7) empfohlen hat; und je nach den Objekten mag man ihn stärker oder schwächer wählen. — Neuerdings ist mir (MAYER) von zwei Forschern, die auf meinen Wunsch obiges analoge Gemisch in ihrer Praxis mit dem Perényischen verglichen haben, versichert worden, dass sie keinen Unterschied zwischen den Wirkungen beider finden. Auch MICHEL (Bull. Sc. France Belg. Tome 31 1899 p. 377) beurtheilt das P. G. in dieser Weise und empfiehlt statt dessen für Anneliden einen Alkohol mit reichlich 3% Salpetersäure. Aehnlich der Botaniker WASIELEWSKI (Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd. 1899 p. 329). — Zum Konserviren von Thieren für Museen und zum Seciren eignet sich Perényis Gemisch oder saurer Alkohol übrigens recht gut.

Ueber ein ähnliches Gemisch s. unten § 834 (HENNINGS).

Ein noch irrationelleres Gemisch hat vor einigen Jahren GRAF (Contrib. Path. Inst. New York State Hosp. Vol. 1/2 1898 No. 15) angegeben: 8 Vol. 1%ige Lösung von Chromsäure, 4 Vol. 8%ige Lösung von Oxalsäure und 3 Vol. Alkohol von 95%. Dabei diskutirt GRAF nicht nur ausführlich alle die möglichen Zersetzungen dieser 3 Stoffe unter sich, sondern schreibt auch selber die Schwellung der Gewebe im Gemisch von Perényi auf Rechnung kleiner Explosionen, die der frei werdende Sauerstoff in den Objekten hervorrufen soll! Natürlich erklärt er sein Gemisch für „the finest preparing fluid“ von allen.

42. Chromessigsäure (FLEMMING, Zellsubstanz p. 382): Chromsäure 2—2½ Theile, Essigsäure 1 Theil, Wasser 1000 Theile. Nachher Färbung mit Hämateïnthonerde (für Safranin oder andere Theerfarben taugen die Präparate nicht).

Ein gutes Fixir- und Härtmittel für Anneliden und wohl auch für andere Thiere ist folgendes von EHLERS angegebene (vielleicht sonst nirgend publizirte) Gemisch: Chromsäure ½—1 g, Wasser 100 ccm, Eisessig 1—5 Tropfen. Diese wenige Essigsäure soll der etwaigen Schrumpfung durch die Chromsäure die Waage halten. — Aehnlich ist LO BIANCOS (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 443) zum Fixiren von Seethieren sehr nützliche Chromessigsäure No. 1, nämlich 1 Theil 50%ige Essigsäure und 20 Theile 1%ige Chromsäure (über seine Chromessigsäure No. 2 s. § 81); nach mündlicher Angabe macht L. sie jetzt übrigens mit der doppelten Menge Essigsäure. — S. auch § 51 das Gemisch von Burchardt.

43. Chromameisensäure. RABL (Morph. Jahrb. 10. Bd. 1884 p. 215) setzt zu 200 ccm einer ⅓%igen Chromsäurelösung 4 oder 5 Tropfen

konz. Ameisensäure, aber erst unmittelbar vor dem Gebrauch. Die Objekte bleiben 12—24 Stunden darin, werden mit Wasser ausgewaschen, in Alkohol gehärtet und mit Hämateïnthonerde oder Safranin gefärbt.

44. Chromosmiumsäure. FLESCH (Arch. Mikr. Anat. 16. Bd. 1879 p. 300) hat ein Gemisch von Osmiumsäure 1, Chromsäure $2^1/_2$, Wasser 1000 Theilen ursprünglich für das Gehörorgan der Vertebraten angegeben. Es lässt auch allgemeine Anwendung zu, ist aber durch Flemmings Gemisch verdrängt worden. — LO BIANCO (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 443) verwendet zum Fixiren von Seethieren ein Gemisch von 1 Theil 1%iger Osmiumsäure und 50 Theilen 1%iger Chromsäure. Neuerdings braucht er aber (nach mündlicher Angabe) statt dessen ein Gemisch von Formol mit Chromsäure (s. unten § 109a).

45. Chromosmiumessigsäure nach FLEMMING (Zellsubstanz p. 381); **schwaches Gemisch:** Chromsäure $2^1/_2$ g, Osmiumsäure 1 g, Eisessig 1 g, Wasser 1 Liter. Eine gute Fixirung erzielt man bereits oft durch kurze Einwirkung (etwa $^1/_2$ Stunde) dieses Gemisches. Man darf es aber auch ohne Nachtheil mehrere Stunden oder Tage, ja nach einigen Autoren (z. B. FLEMMING in: Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. 1897 p. 174) sogar Wochen oder Monate einwirken lassen. Hinterher wäscht man sehr sorgfältig mit Wasser aus und färbt entweder in toto mit Hämateïnthonerde (s. hierüber auch unten § 832 DUBOSCQ) oder noch besser die Schnitte mit Safranin, anderen Theerfarbstoffen, Eisenhämatoxylin oder Kernschwarz.

Um sich das Gemisch aus den vorräthigen Lösungen zu bereiten, nehme man

1 %ige Chromsäure 25, 1 %ige Essigsäure 10,
1 %ige Osmiumsäure 10, Wasser 55 Maasstheile.

Hat man die Osmiumsäure, wie oben § 34 empfohlen, mit Chromsäure zusammen gelöst vorräthig, so nimmt man 20 Maasstheile Chromsäure von 1 %, 5 von dieser Osmiumlösung und 65 Wasser. (Ueber das allmähliche Verderben dieser Lösungen s. im folgenden §.)

Man braucht übrigens das Gemisch durchaus nicht immer ängstlich genau so zu machen, wie ursprünglich vorgeschrieben. So empfiehlt FOL (Lehrbuch p. 100) zu nehmen: 1%ige Chromsäure 25 Maasstheile, 1%ige Osmiumsäure 2, 2%ige Essigsäure 5 und Wasser 68 Maasstheile. Mithin ist sein Gemisch an Osmiumsäure viel schwächer als das von Flemming. Noch schwächer an Osmiumsäure (nur 1 Vol. an Stelle der 2 Vol.) ist das Gemisch von CORI (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1890 p. 441). Ueber das Gemisch von WISTINGHAUSEN s. unten § 625.

Die Meinungen über **Art und Erfolg der Wirkung** dieses und des sogenannten starken Flemmingschen Gemisches (s. § 46) sind äusserst verschieden. Während z. B. Flemming die treue Fixirung der Zelltheilung auf die rasch tödtende Osmiumsäure, ihre Verdeutlichung auf die beiden anderen Säuren zurückführt, kommt Fischer (Fixirung etc. p. 27) ungefähr zum umgekehrten Resultate und meint, das Gemisch sei durchaus kein unfehlbares Fixirmittel, sondern „erst recht geeignet, Artefakte zu erzeugen" (p. 28). Man kann diesem Schluss mit einiger Reserve zustimmen, darf aber darauf hinweisen, dass schon Flemming selbst und Andere es nicht als universell bezeichnet haben. Wenn es oft das nicht leistet, was man sich davon verspricht, so liegt dies daran, dass man es am unrechten Ort anwendet oder von vornherein zu grosse Anforderungen daran stellt.

Zu verwenden ist dieses Gemisch (ähnlich dem folgenden) nur bei **sehr kleinen** Objekten oder entsprechend kleinen Stücken grösserer Objekte, da sonst die Resultate in den tieferen Schichten gar zu sehr von den normalen abweichen. Denn mehr als etwa 5 Zellschichten tief fixirt es selbst in lockeren Geweben die Elemente nicht in der richtigen Weise, nämlich mit guter Erhaltung der Structur und starken optischen Differenzen.

Auch zum **Härten**, z. B. von Nervengewebe, lässt es sich mit Vortheil brauchen.

46. Chromosmiumessigsäure nach Flemming (Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 349); **starkes Gemisch:** 1 %ige Chromsäure 15 Maasstheile, 2 %ige Osmiumsäure 4 Maasstheile, Eisessig 1 Maasstheil (oder weniger).

Hat man 2 %ige Osmiumsäure nicht zur Hand, so nehme man 10 %ige Chromsäure 15, 1 %ige Osmiumsäure 80, Eisessig 10 und Wasser 95 Maasstheile.

Grosse Vorräthe von diesem Gemisch können mit der Zeit verderben, weil die Essigsäure allmählich die Osmiumsäure reduzirt (Merk in: Sitzungsb. Akad. Wien 108. Bd. 3. Abth. 1899 p. 361). Es empfiehlt sich daher, es häufiger in kleinen Portionen aus Lösungen zusammenzugiessen, in denen die Osmiumsäure von der Essigsäure getrennt gehalten wird. Man habe also vorräthig: A. 1 %ige Chromsäure 11 Theile, Wasser 4 Theile, Eisessig 1 Theil, ferner B. eine 2 %ige Lösung von Osmiumsäure in 1 %iger Chromsäure, und mische dann beim Bedarf 4 Theile von A. mit 1 Theil von B. Oder man halte das ganze Gemisch mit Ausnahme der Essigsäure fertig und setze vor dem Gebrauch 5 % Eisessig hinzu.

Man braucht sich übrigens durchaus nicht genau an die von Flemming angegebenen Verhältnisse zu halten. So verwendet z. B. Carnoy (La Cellule Tome 1 1885 p. 211) ein noch stärkeres Gemisch. — Podwyssozki (Beitr. Path.

Anat. Ziegler 1. Bd. 1886 p. 287; Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 405) empfiehlt namentlich für Drüsen ein Gemisch mit Sublimat, nämlich Chromsäure zu 1% in $1/2$%iger Sublimatlösung gelöst 15 ccm, 2%ige Osmiumsäure 4 ccm, Eisessig 6—8 Tropfen. Das Sublimat soll das Eindringen der Osmiumsäure erleichtern, aber der Färbung schaden; von der Essigsäure ist weniger genommen worden, um das Schwellen der histologischen Elemente zu verhindern.

Sein starkes Gemisch hat Flemming in erster Linie für die Jagd auf Kernfiguren und Nucleolen — beiderlei Gebilde werden durch die nachherige Färbung mit Safranin oder Gentianaviolett besonders deutlich — empfohlen und durchaus nicht im Allgemeinen. Später zeigte es sich jedoch in manchen anderen Fällen anwendbar und alsdann dem schwachen Gemisch bedeutend überlegen. Nur passt es noch weniger für alle Objekte als letzteres, und Flemming hat schliesslich selbst darauf hingewiesen, dass einige Forscher es für Zwecke brauchen, für die es nicht taugt.

An Volum braucht man vom starken Gemisch nur etwa 4 mal so viel, wie das der Objekte beträgt, kann aber auch mehr nehmen. Nach Flemming bleiben diese wenigstens 1, besser 2—3 Tage darin (auch wohl Monate lang); Nachbehandlung wie beim schwachen Gemisch.

Im starken Gemisch werden die Gewebe nicht tiefer braun, als im schwachen, eher weniger tief. Die Wirkung beider Gemische auf Fett etc. ist übrigens ähnlich wie bei der Osmiumsäure (s. oben p. 31).

47. Ueber Hermanns Modification von Flemmings Gemisch (**Hermanns Gemisch**) s. unten § 72, über ein Gemisch von Chromsäure mit Platinchlorid (**Merkels Gemisch**) § 71, mit Pikrinsäure § 91, mit Sublimat § 67.

48. Salpetersäure. Altmann (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1881 p. 219) gebraucht zum Fixiren von Embryonen verdünnte Salpetersäure (3—$3^1/_2$% reine Säure), die ein spezif. Gewicht von etwa 1.02 hat, lässt aber die Säure nur $1/4$—4 Stunden lang wirken. Stärkere Gemische ergaben ihm kein so gutes Resultat. Nach längerem Probiren habe ich (Lee) mich davon überzeugt, dass die Altmannsche Säure zu schwach zum allgemeinen Gebrauch ist. Mir (Mayer) hat 5%ige Säure zum Fixiren der Eier von Dekapoden gute Dienste geleistet.

Bethe (Zeit. Wiss. Mikr. 17. Bd. 1900 p. 22) behandelt Nervengewebe von Wirbelthieren mit Salpetersäure von 3—$7^1/_2$% (die konzentrirte hat das spezif. Gewicht von 1.40) absichtlich, damit nicht alles in den Zellen fixirt werde. Dies würde mit der Angabe von Fischer (Fixirung etc. p. 9) harmoniren, Salpetersäure sei, ob wässerig oder mit Alkohol verdünnt, ein unzuverlässiges Mittel. — Tellyesniczky (Arch. Mikr. Anat. 52. Bd. 1898 p. 222) hat gerade von schwacher Säure (2—$2^1/_2$%) günstige, von stärkerer (5%) weniger gute Resultate

gehabt. — Benda dagegen (Anat. Anzeiger 3. Jahrg. 1888 p. 706) legt die Objekte auf 1–2 Tage in Salpetersäure von 10 % (also wie His, s. Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. 1877 p. 115), von da direkt auf wenigstens 2–3 Tage in Lösungen von Kaliumbichromat, deren Stärke von einer 1/4 konzentrirten bis zu 1/2 konzentrirten allmählich ansteigt, wässert sie später gründlich aus und schneidet sie entweder gefroren oder nach Einbettung in Celloidin (für Paraffin werden sie zu hart). Die Schnitte sollen sich, wenn auch langsam, doch gut färben.

Nicolas (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 8. Bd. 1891 p. 3) verwendet für den Darm der Wirbelthiere eine 3 %ige Salpetersäure mit 1/2 % Osmiumsäure und findet die Gewebe hinterher besser färbbar, als wenn sie mit Flemmings Gemisch fixirt werden.

Zum Auswaschen darf man, wenn nur mit Salpetersäure fixirt wurde. kein Wasser, sondern nur Alkohol nehmen (schon von Altmann angegeben), am besten wohl 70 %igen.

Ueber Salpetersäure und Alkohol s. oben p. 28, p. 33 und unten § 103.

49. Schweflige Säure. Waddington (Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 3 1883 p. 185) empfiehlt eine gesättigte Lösung von schwefliger Säure in Alkohol (hergestellt durch Einleiten des Gases) statt der Osmiumsäure zum Fixiren. — Ebenso Overton (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 9).

50. Jod. Es dringt sehr gut ein und härtet beträchtlich. Nach Kent (Manual of the Infusoria 1881 p. 114; Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 3 1883 p. 730) wirkt es auf Infusorien fast genau so wie Osmiumsäure und mitunter sogar noch besser. Kent sättigt eine konzentrirte Lösung von Jodkalium in destillirtem Wasser mit Jod und verdünnt sie bis zur Farbe von tiefbraunem Wein. Zum Wasser mit den Infusorien braucht man davon nur sehr wenig zuzusetzen. Oder man nimmt Lugols Gemisch (Wasser 100, Jodkalium 6, Jod 4 Theile) oder für kleine Seethiere eine Lösung von Jod in Seewasser.

Jod tödtet die Zellen sehr rasch, ohne ihre Form zu verändern. Mir (Lee) hat es beim Studium der Spermatozoen sehr gute Dienste geleistet. Leider scheint es kein Färbgemisch zu geben, das sich mit Jod vertrüge.

Sehr kleine Objekte kann man nach Overton (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 14) durch **Joddämpfe** plötzlich fixiren. Jodkristalle erhitzt man in einem Reagensrohre, bis Dämpfe aufsteigen, dann neigt man das Rohr und lässt die schweren Dämpfe über den Objektträger mit den Objekten darauf hinströmen. Man muss ihn dann aber 2–3 Minuten lang auf etwa 40° C. erwärmen, um das Jod wegzuschaffen, und kann nun die Objekte einschliessen oder sonstwie weiter behandeln. — Ueber **Jodalkohol** zum Fixiren von Radiolarien s. § 876, zum Härten des Gehirns (nach Betz) § 680.

Arnold (Arch. Mikr. Anat. 52. Bd. 1898 p. 135 u. 763) braucht Jodjodkalium in Wasser zur Darstellung seiner Granula, aber es handelt sich dabei offenbar mehr um eine Maceration als um eine wirkliche Fixirung.

51. Allgemeines über die Bichromate. Burchardt, der speziell die Konservirung des Zellkerns durch Bichromate studirt hat (La Cellule

Tome 12 1897 p. 335), unterscheidet die kernzerstörenden (die Alkalisalze, ferner das Ammonium-, Magnesium-, Strontium- und Zinksalz) und die kernerhaltenden (das Baryum-, Calcium- und Kupfersalz). In Müllers Gemisch scheint das Natriumsulfat die Wirkung des Bichromats auf den Kern abzuschwächen. Das Zinksalz bildet den Uebergang von der 1. Gruppe zur 2., die aber vom Kerne auch nur das Chromatin konservirt. Zum bessern Eindringen muss Essigsäure zugesetzt werden, und um deren schädliche Wirkungen auf das Cytoplasma abzuschwächen, ein Salz der 1. Reihe; daraus resultirt als Gemisch zum Fixiren von Plasma und Kern die Kombination von: Bar. bichrom. 4 %ig 12 Vol., Kal. bichrom. 5 %ig 6 Vol. und Eisessig 1 Vol. (Das Baryumsalz kann auch durch 4 %iges Calcium- .oder 6 %iges Kupferbichromat ersetzt werden.) Nimmt man Chromsäure 1 %ig 12 Vol., Kal. bichrom. 5 %ig 6 Vol., Eisessig 1 Vol., so wird auch die achromatische Figur gut erhalten. Weniger gut sind Gemische der 2. Gruppe mit Platinchlorid und Eisessig oder mit Sublimat und Eisessig, von denen Burchardt mehrere angiebt.

Zu ähnlichen Resultaten ist ohne Kenntniss von Burchardts Untersuchung Tellyesniczky (Arch. Mikr. Anat. 52 Bd. 1898 p. 229) gekommen, der sich allerdings auf das Kaliumbichromat beschränkt hat, aber ebenfalls nicht dieses Salz für sich, sondern nur in Verbindung mit Essigsäure als gutes Fixirmittel anerkennt (Genaueres s. § 55). — Auch Fischer (Fixirung etc. p. 15) rechnet das Kaliumbichromat zu den schwachen Fällungsmitteln; es bedürfe zur Aeusserung seiner fällenden Eigenschaften des Zusatzes einer freien Säure.

52. Kaliumbichromat. Dies ist vielleicht das wichtigste aller Härtmittel sensu stricto. Es härtet langsam, viel langsamer als Chromsäure, verleiht aber den Geweben eine unvergleichlich bessere Konsistenz und macht sie auch bei ganz langer Einwirkung nicht so spröde. In der That dürfen sie ihm ohne viel Schaden fast unbegrenzt lange ausgesetzt werden.

Die Stärke der üblichen wässerigen Lösungen variirt von 2—5 %. Wie bei der Chromsäure, so ist es auch hier äusserst wichtig, mit schwachen Lösungen zu beginnen und erst allmählich zu stärkeren zu greifen. Zur Härtung des Auges eines Schafes braucht man mit Lösungen, die von 2 % auf 4 % steigen, etwa 3 Wochen. Ein Rückenmark erfordert 3—6 Wochen, ein Gehirn wenigstens ebenso

viele Monate. — Ueber die Härtung nach Fixirung mit Salpetersäure s. § 48 (Benda).

Nach der Härtung muss man die Objekte vor dem Einlegen in Alkohol sorgfältig mit Wasser auswaschen (s. jedoch § 40) und jedenfalls mit dem Alkohol ins Dunkle stellen. Will man aber eine gute Färbung mit Karmin erzielen, besonders mit Ammoniakkarmin, das sich für so gehärtete Stücke vom Nervensystem vorzüglich eignet, so darf man die Objekte vor dem Färben auch nicht einen Augenblick in Alkohol bringen.

Böhm & Oppel (Taschenbuch 3. Aufl. 1896 p. 22; 4. Aufl. 1900 p. 10) fixiren sowohl mit Kaliumbichromat als auch mit Müllers Gemisch (§ 53) im Dunkeln.

Zum Fixiren ist das Kaliumbichromat für sich allein nicht geeignet (s. § 51). Man ist daher auch schon lange, besonders durch Flemming, von seiner Benutzung dazu völlig zurückgekommen. Dagegen wird es neuerdings in Verbindung mit Essigsäure (ohne oder mit Sublimat) wieder mehr angewandt (s. § 55 und 68), ferner auch wohl mit Formol (§ 109a).

53. Müllers Gemisch (bereits in: Verh. Physik. Med. Ges. Würzburg 10. Bd. 1859 p. 180 erwähnt, aber ohne genauere Angaben): Kaliumbichromat 2—2½ g, Natriumsulfat 1 g, Wasser 100 ccm. Es war früher ungemein beliebt, scheint aber neuerdings viel weniger gebraucht zu werden. Man lässt es ebenso lange einwirken wie das reine Kaliumbichromat, und auch die weitere Behandlung der Objekte ist die gleiche. Die Ansichten darüber sind noch getheilt, ob es besser oder schlechter wirkt als das einfache Bichromat; jedenfalls ist für die meisten Objekte der Unterschied zwischen beiden Mitteln nicht bedeutend.

54. Erlickis Gemisch. (*Warschauer Med. Zeit. 22. Jahrg. No. 15 und 18; *Progrès médical 1877 Nr. 39): Kaliumbichromat 2½ g, Kupfersulfat 1 g, Wasser 100 ccm. Der Zusatz des Kupfersulfates ist verständlich: es härtet ja selber ziemlich energisch und mag daher das immerhin träge Bichromat verstärken. Jedenfalls härtet dieses Gemisch sehr viel rascher als das Müllersche oder die einfache Lösung des Bichromates: ein Rückenmark braucht nur 4 Tage, allerdings bei der Wärme eines Brütofens, und nur 10 Tage bei gewöhnlicher Temperatur (Fol, Lehrbuch p. 106). Es ist wohl eins der besten Härtmittel für voluminöse Objekte. Menschliche Embryonen von einigen Monaten können bequem darin gehärtet werden.

Stücke vom Centralnervensystem, die in Erlickis Gemisch gehärtet worden sind, zeigen oft dunkle Flecken mit unregelmässigen Ausläufern ähnlich Ganglienzellen. Man hat sie früher als krankhafte Gebilde betrachtet, weiss aber nun, dass es Niederschläge sind. Sie lassen sich durch Waschen mit heissem Wasser oder mit ganz verdünnter Salzsäure; oder indem man die Stücke vor dem Ueberführen in Alkohol mit $^1/_2$ %iger Chromsäure behandelt, wegschaffen (Tschisch in: Arch. Path. Anat. 97. Bd. 1884 p. 173; Edinger in: Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 245).

55. Kaliumbichromat und Essigsäure nach Tellyesniczky (Arch. Mikr. Anat. 52. Bd. 1898 p. 242): Kaliumbichromat 3 g, Essigsäure 5 ccm, Wasser 100 ccm. Kleine Objekte werden darin 1—2 Tage, grössere länger gelassen, mit Wasser sehr gut ausgewaschen und zuerst in Alkohol von 15%, dann allmählich in immer stärkeren gebracht. Man braucht sich übrigens, wie T. selber angiebt, nicht genau an obige Formel zu halten, denn das Wesentliche daran ist nur die Kombination des das Plasma gut fixirenden Bichromates mit der besonders die Kernstruktur erhaltenden Essigsäure.

Ein ähnliches, nur komplizirteres Gemisch hat bereits Burchardt empfohlen (§ 51), und zwar auf Grund vergleichender Untersuchungen; es ist aber, vielleicht weil das Baryumbichromat sonst ganz ungebräuchlich ist, noch gar nicht in Aufnahme gekommen.

56. Kaliumbichromat und Osmiumsäure. Lo Bianco (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 443) hat früher für Seethiere ein Gemisch von 100 ccm 5%iger Lösung von Kaliumbichromat und 2 ccm 1%iger Osmiumsäure verwandt, ist aber (nach mündlicher Mittheilung) zu Gunsten des Formaldehyds ganz davon zurückgekommen.

Altmann (Die Elementarorganismen, Leipzig 1890 p. 27 u. 30; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 199) empfiehlt zur Deutlichmachung seiner Granula in den Zellen, die Gewebe in einem Gemisch gleicher Theile von 5%iger Lösung von Kaliumbichromat und 2%iger Lösung von Osmiumsäure zu fixiren. Das Bichromat darf aber keine freie Chromsäure enthalten. S. hierüber die Kritik bei Fischer (Fixirung etc. p. 16).

Hoehl (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. 1896 p. 32) verwendet ein ähnliches Gemisch unter Zusatz von Essigsäure zum Fixiren von Zähnen. Er nimmt 40 Vol. einer 3%igen Lösung von Kaliumbichromat, 10 Vol. einer 1%igen Osmiumsäure und 1 Vol. Essigsäure.

57. Kaliumbichromat, Osmiumsäure und Platinchlorid nach Johnson (Vorschrift von 1895 nach privater Mittheilung an Lee): $2^1/_2$ %ige Lösung von Kaliumbichromat 70, 2%ige Lösung von Osmiumsäure 10, 1%ige Lösung von Platinchlorid 15, Essig- oder Ameisensäure 5 Theile. Man nehme nicht mehr Platinchlorid, als hier vorgeschrieben, denn sonst bilden sich in den Geweben leicht Kristalle. — Henneguy, der dies Gemisch nach seinen vielen Erfahrungen damit sehr rühmt, sagt (Leçons sur la cellule, Paris 1896 p. 61),

man füge am besten die Essig- oder Ameisensäure erst kurz vor dem Gebrauche zu, da sie häufig das Osmium und Platin von selbst so reduzire, dass das Gemisch ganz schwarz werde.

Das Gemisch wurde zur vorläufigen Härtung der Retina erdacht, sollte nur 2 Stunden einwirken und dann durch reine Lösung von Kaliumbichromat ersetzt werden. Indessen ist es auch auf andere Gewebe vortrefflich anwendbar. Die Osmiumsäure hat den Zweck, das Härtvermögen des Gemisches zu erhöhen; nach JOHNSON kann man daher eine Retina schon in 3 Tagen zum Schneiden fertig in Celloidin eingebettet haben.

58. Ueber Gemische von Kaliumbichromat und Sublimat, besonders über **Zenkers Gemisch**, s. unten § 68.

59. Die Gemische von **Kaliumbichromat und Alkohol** sind, wenn auch nicht in so hohem Grade, gleich denen der Chromsäure mit Alkohol der Zersetzung unterworfen und daher nicht sonderlich rationell, wahrscheinlich auch ziemlich überflüssig. Von ihren Erfindern werden folgende empfohlen.

Nach KULTSCHITZKY (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 348) löst man Kaliumbichromat und Kupfersulfat bis zur Sättigung in 50%igem Alkohol und setzt kurz vor dem Gebrauch auf je 100 ccm 5 oder 6 Tropfen Essigsäure hinzu. (Die fein pulverisirten Salze lässt man im Dunkeln 24 Stunden in Berührung mit dem Alkohol.) Auch die Objekte müssen im Dunkeln 12 bis 24 Stunden lang in dem Gemisch bleiben, denn im Hellen giebt es Präzipitate. Dann kommen sie auf 12—24 Stunden in starken Alkohol und sind nun schneidfähig.

Neuerdings (Arch. Mikr. Anat. 49. Bd. 1897 p. 8) verwendet KULTSCHITZKY zum Fixiren ein Gemisch von 2 Theilen Kaliumbichromat, ¼ Theil Sublimat, 50 Theilen 2%iger Essigsäure und 50 Theilen Alkohol von 96%. Da ein Theil des Bichromats ausfällt, so soll man die Flüssigkeit erst nach 24 Stunden filtriren. Man lässt die Gewebe von Wirbelthieren 4—6 Tage lang darin.

HAMILTON nimmt zum Härten von Gehirnen 1 Theil 90%igen Alkohol und 3 Theile Müllers Gemisch (s. § 682). Während des Härtens müssen die Präparate im Dunkeln stehen. Der Alkohol soll die Härtung beschleunigen.

60. Ammoniumbichromat. Nach der Literatur darüber zu urtheilen, ist dies doppeltchromsaure Salz zum Härten ziemlich in Gunst, warum aber, ist nicht recht klar. Es wirkt ganz ähnlich dem Kalisalze. FOL (Lehrbuch p. 105) giebt an, es dringe etwas rascher ein und härte etwas langsamer. Es muss aber in etwas stärkeren Lösungen, bis zu 5%, gebraucht werden.

60a. Ammoniummonochromat wird von einigen Forschern vorgezogen und in der nämlichen Stärke wie das Bichromat verwandt. KLEIN (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 18 1878 p. 319) empfiehlt es für den Darm von *Triton*, den es in 5%iger Lösung in 24 Stunden härtet.

61. Quecksilberchlorid oder **Sublimat.** Es löst sich in etwa 15 Theilen kaltem und in weniger als 3 Theilen kochendem Wasser. Sehr leicht löslich ist es ferner in Alkohol (in absolutem etwa 1 : 3) und in Aether (etwa 1 : 4). Die Löslichkeit in allen dreien wird noch vermehrt durch Zusatz von Kampher, Salzsäure oder Chlorammonium; mit letzterem und auch mit Chlornatrium bildet es leicht lösliche Doppelsalze, sodass Seewasser bei gewöhnlicher Temperatur sogar über 15 % löst.

Zum Lösen in Wasser verwende man nur destillirtes, kein gewöhnliches; alsdann sind die Lösungen bis auf die Bildung eines unbedeutenden Niederschlages (wahrscheinlich von Quecksilberchlorür) unbegrenzt lange haltbar. Da die Lösbarkeit je nach der Temperatur sehr schwankt (s. oben), so können sich Kristalle von Sublimat, meist lange Nadeln, ausscheiden; es ist daher auch ungenau, wenn die Autoren in ihren Vorschriften schlechtweg von konzentrirten Lösungen reden.

Die Lösungen in destillirtem Wasser müssen auf Lakmuspapier deutlich sauer reagiren, die in starken Lösungen von Kochsalz sind neutral.

Zum Fixiren werden sehr oft die Sublimatlösungen unvermischt gebraucht, und das geht auch an, aber meist wird die Fixirung besser, wenn man Essigsäure hinzugesetzt hat, etwa 5 %. van Beneden hat eine gesättigte Lösung von Sublimat in 25 %iger Essigsäure empfohlen, und Lo Bianco (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 443) verwendet sogar ein Gemisch von 2 Theilen gesättigter Sublimatlösung und 1 Theil Essigsäure von 49 %, allerdings mehr zum rapiden Tödten kontraktiler Seethiere als zum eigentlichen Fixiren.

Zuweilen ist es rathsam, die allerstärkste Lösung zu nehmen. Meist genügt eine kalt gesättigte Lösung (also von 6—7 %), aber bei sehr kontraktilen Thieren, wie Korallen und Planarien, braucht man eine warm oder sogar heiss gesättigte Lösung. Für Arthropoden ist oft eine Lösung in Alkohol gut (§ 62 d). Zarte Objekte hingegen erfordern unter Umständen schwächere Lösungen. Für einige Seethiere sind Lösungen in Seewasser unbedingt erforderlich, für andere wahrscheinlich auch indizirt, indessen fehlen darüber absolut beweisende ausgedehnte Versuche noch.

Die Objekte müssen stets aus den Fixirlösungen herausgenommen werden, sobald sie fixirt sind, mit anderen Worten, sobald sie durch und durch opak geworden, d. h. von der Flüssigkeit ganz durch-

drungen sind. Für kleine Objekte genügen einige Minuten, ja, für die Speicheldrüsen der Larve von *Chironomus* schon wenige Sekunden.

Auszuwaschen ist mit Wasser oder noch besser mit Alkohol, und man nimmt zweckmässig etwa 70 $^0/_0$igen, setzt aber nach Mayer (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 4. Bd. 1887 p. 43) ein wenig Jodtinktur zur Waschflüssigkeit hinzu und wechselt diese, bis sie nicht mehr durch die Objekte entfärbt wird. In hartnäckigen Fällen, also bei grossen Objekten mit voluminösen Lücken im Innern oder auch bei schwer durchdringlichen Geweben, wo die Jodtinktur nicht ausreichen würde, nehme man (s. die Angabe von Mayer in der 1. Auflage dieses Buches p. 38) Jodjodkalium. Von diesem mag man das Gemisch einer Lösung von 5 g Jodkalium in 5 ccm Wasser und von 0,5 g Jod in 45 ccm 90 $^0/_0$igem Alkohol vorräthig halten und nach Bedürfniss in das Waschwasser oder den Waschalkohol einträufeln (s. auch Mayer in: Internation. Monatschr. Anat. Phys. 4. Bd. 1887 p. 383 und in: Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 28 Anm. 1; ähnlich Apáthy in: Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1897 p. 729 u. 730).

Natürlich kann man auch Lugols Gemisch zu diesem Zweck brauchen: die Hauptsache ist, dass man Jod und Jodkalium zugleich verwendet. Die thierischen Gewebe reduziren nämlich das aus dem Fixirmittel aufgenommene Sublimat wenigstens zum Theil zu Quecksilberchlorür oder irgend einem Oxydulsalze; bringt man nun freies Jod (Jodtinktur) hinzu, so entsteht zwar Quecksilberjodid, aber dieses ist in Alkohol allein lange nicht so leicht löslich wie bei Gegenwart von Jodkalium. Setzt man andererseits nur Jodkalium zur Waschflüssigkeit, so bildet sich unlösliches Quecksilberjodür, das erst bei Gegenwart von freiem Jod in das Jodid übergeht. Wenn also Fischer (Fixirung etc. p. 23) Jodkalium allein für genug erklärt, so irrt er sich.

Es ist wichtig, das Quecksilber sorgfältig aus den Geweben durch Jod wegzuschaffen, denn sonst werden diese brüchig und färben sich auch nicht gut; auch bilden sich oft in den Präparaten, wenn sie einige Zeit in Balsam gelegen haben, eigenthümliche undurchsichtige Gebilde (Stecknadeln oder nur die Köpfe davon etc.) mitten in den Geweben. Will man also absolut sicher gehen, so behandle man auch die aufgeklebten Schnitte vor dem Färben mit einer schwachen alkoholischen Lösung von Jodjodkalium.

Mann (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 479) hält es geradezu für schädlich, die mit Sublimat fixirten Objekte vor dem Schneiden mit Jod zu behandeln, da sie dadurch weich werden und in Paraffin schrumpfen. Er braucht daher das Jodjodkalium in wässeriger Lösung erst für die Schnitte. — Schaper (Anat. Anzeiger 13. Bd. 1897 p. 463)

hingegen zeigt, dass es unter Umständen sehr schädlich ist, wenn man die Behandlung der Gewebe mit Jod erst in den Schnitten, nicht schon vor dem Einbetten in Paraffin vornimmt.

Die Lösungen von Sublimat dürfen nicht mit Eisen- oder Stahlgeräthschaften in Berührung kommen, denn es bilden sich sonst Niederschläge, die den Objekten schaden könnten. Man nehme daher zum Anfassen oder Bewegen der Objekte Holz oder Glas und zum Zerlegen Igelstacheln, Gänsefedern, am besten aber (mit Eisig) Kaktusstacheln.

Bei richtiger Anwendung ist Sublimat im Allgemeinen unzweifelhaft eins der besten Fixirmittel. Es lässt sich fast bei allen Arten von Thieren gebrauchen. Vielleicht empfiehlt es sich ohne weitere Zusätze nicht so sehr für Arthropoden, da es nicht leicht durch Chitin durchdringt. Für Zellenstudien hingegen steht es nicht auf der Höhe der Gemische von Flemming etc. und gibt namentlich nicht so feine optische Differenzirungen wie diese, bringt auch die Zellen leicht zum Schrumpfen. Dagegen ist es ein grosser Vortheil der meisten Sublimatgemische, dass wohl alle Arten von Färbungen hinterher mit den Objekten vorgenommen werden können.

Das Sublimat wurde, nachdem es bereits relativ früh von Goadby und Anderen als Zusatz zu Einschliessmitteln für die mikroskopischen Präparate, später auch, aber nur gelegentlich, von Blanchard (Ann. Sc. N. (3) Tome 8 1847 p. 274: für Planarien), Remak (Arch. Anat. Phys. 1854 p. 99: $^{1}/_{5}$ %; ebenso ibid. 1856 p. 468 für die elektrischen Organe von *Torpedo*), Frey (Mikroskop 1. Aufl. 1863 p. 99: zur „Erhärtung und Isolirung des Axencylinders") und Kölliker (Icones histiol. Leipzig 1864 p. 12: $^{1}/_{16}$ -1 % für *Paramaecium*) benutzt worden war, erst durch Lang (1878; s. § 63) recht eigentlich als allgemeines Fixirmittel empfohlen. Seitdem wird es theils für sich, theils in Verbindung mit allen möglichen anderen Substanzen zum Fixiren ungemein viel angewandt.

62. Von den überaus zahlreichen Formeln für die Anwendung des **Sublimates** in Gemischen mit Chlornatrium oder Essigsäure, Alkohol, Pikrinsäure etc. seien zunächst folgende relativ einfache angegeben.

a) mit **Chlornatrium.** Eine Lösung von 5 Theilen Sublimat und $^{1}/_{2}$ Theil Chlornatrium in 100 Theilen Wasser wird wohl als Gaulesche Lösung bezeichnet. — Heidenhain (Festschrift Kölliker Leipzig 1892 p. 109) empfiehlt eine $^{1}/_{2}$ %ige Lösung von Chlornatrium heiss mit Sublimat gesättigt. Sobotta (Arch. Mikr. Anat. 50. Bd. 1897 p. 21)

aber warnt nachdrücklich vor der „kolossal schrumpfenden Wirkung namentlich der konzentrirten Kochsalzsublimatlösung". — In einer 0,75%igen Kochsalzlösung lösen sich bei 20° C. reichlich 11% (Mayer). — S. auch unten d) und § 63.

b) mit **Seesalz.** Eine konzentrirte Lösung von Sublimat in Seewasser, also mit etwa 3½% anderen Salzen, dient zur Fixirung mancher Seethiere und ist nach mündlicher Angabe von Giesbrecht für zarthäutige Crustaceen (Copepoden etc.) insofern der gewöhnlichen Sublimatlösung überlegen, als in letzterer die ungeöffnet fixirten Thiere stets platzen. — S. auch unten c) Eisig.

c) mit **Essigsäure** (mit oder ohne Chlornatrium etc.). Eine konzentrirte (also 6—7%ige) oder eine 5%ige Lösung von Sublimat in destill. Wasser, mit 5% Essigsäure versetzt, wirkt oft besser als ohne diese Säure. — Kaiser (Bibl. Z. 7. Heft 1891 p. 4; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 363) benutzt ein schwächeres Gemisch, nämlich 10 g Sublimat, 3 g Eisessig und 300 Wasser; ähnlich Goto (Journ. Coll. Sc. Japan Vol. 10 1898 p. 239): 16 Theile konzentr. wässerige Sublimatlösung, 3 Th. Glycerin, 1 Th. Eisessig und 50 Th. Wasser. Hingegen Davidoff (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1889 p. 118): 3 Theile konzentrirte wässerige Sublimatlösung und 1 Theil Eisessig; Eisig (ibid. 13 Bd. 1898 p. 89) nimmt zwar dieselben Mengen, aber das Sublimat zu 5% in Seewasser gelöst. Die Essigsäure in relativ so grossen Mengen scheint übrigens die Färbbarkeit der Kerne stark herabzusetzen. S. auch oben p. 43 sowie unten d) und § 63 und 66.

d) mit **Alkohol** (mit oder ohne Essigsäure, Chlornatrium etc.). Zuerst wohl von Frenzel angewandt (s. § 64), später von Mingazzini (Ricerche Lab. Anat. Roma Vol. 3 1893 p. 47): 2 Vol. konz. wässerige Sublimatlösung, 1 Vol. Eisessig und 1 Vol. absol. Alkohol; von Apáthy (Mikrotechnik p. 111): 3—4 g Sublimat und ½ g Kochsalz in 100 ccm 50%igem Alkohol; von Carazzi (Manuale p. 28): 8 g Sublimat, 50 ccm Alkohol (von 90%), 100 ccm ½%ige Lösung von Kochsalz in destill. Wasser, 5 ccm Eisessig; von Ohlmacher (Journ. Exper. Med. Vol. 3 1897 p. 671): absoluter Alkohol 80, Chloroform 15, Eisessig 5 ccm, darin Sublimat bis zur Sättigung gelöst (etwa 20 g). S. ferner § 83.

e) mit **Aceton.** Held (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. 1897 p. 227) verwendet zum Fixiren von Nervengewebe eine „1 proc. Lösung von

Sublimat in 40 proc. Aceton" und wäscht die Objekte dann „durch langsam steigende Acetonlösungen" aus.

f) mit **Phenol.** PAPPENHEIM (Arch. Path. Anat. 157. Bd. 1899 p. 23): wässerige Sublimatlösung mit Phenol (Karbolsäure) geschüttelt und filtrirt.

g) mit **Formol.** S. unten § 109e.

h) mit **Borsäure.** S. unten § 879.

Ausserdem existiren viele zum Theil äusserst komplizirte und wohl auch auf gut Glück zusammengebraute Gemische. Die wesentlichsten seien hier aufgeführt.

63. Sublimat nach LANG (Z. Anzeiger 1. Jahrg. 1878 p. 14) für Planarien: Wasser 100 ccm, Chlornatrium 6—10 g, Essigsäure 6—8 g, Sublimat 3—12 g (zuweilen Alaun 1/2 g). — Zweite Vorschrift (ibid. 2. Jahrg. 1879 p. 46): konzentrirte Lösung von Sublimat in Pikrinschwefelsäure, der man vorher 5% Essigsäure zugesetzt hat.

64. Sublimat und Salpetersäure. FRENZEL (Arch. Mikr. Anat. 26. Bd. 1886 p. 232) verwendet eine halbgesättigte Lösung von Sublimat in 80%igem Alkohol. Zum Fixiren setzt er ihr auf je 1—2 ccm 1 Tropfen Salpetersäure zu, lässt die Objekte 5—10 Minuten darin, bringt sie darauf in die nicht angesäuerte Lösung und von ihr später direkt in 90%igen Alkohol.

GILSON (La Cellule Tome 14 1898 p. 374) nimmt ein Gemisch von Salpetersäure von 46° (also etwa 1.456 p. sp. oder 80%) 15 ccm, Eisessig 4 ccm, Sublimat 20 g, 60%igem Alkohol 100 ccm, Wasser 880.

Für Seethiere setze man einige Kristalle von Jod hinzu, um die Niederschläge der Seesalze zu verhindern. Sollten aber die Präparate dennoch körnige Niederschläge zeigen, die vielleicht von reichlichen Phosphaten in den Geweben herrühren, so wasche man mit Wasser und etwas Jodtinktur.

Ich (LEE) habe dieses Gemisch nach der älteren Vorschrift (1. Auflage dieses Buches p. 40) probirt und finde, es fixirt im Allgemeinen zart und treu, verleiht auch den Geweben eine vorzügliche Konsistenz. Die Objekte können ohne Schaden lange darin bleiben, und insofern ist es namentlich Anfängern sehr zu empfehlen. Auch dringt es sehr leicht ein. Die Objekte färben sich hinterher stets sehr gut. Legt man Eier von Batrachiern einige Tage hinein, so lässt sich die Gallertschicht leicht entfernen. Für einige Objekte verstärkt man übrigens mit Vortheil den Gehalt an Sublimat.

CARAZZI (Manuale p. 29) gibt folgende Modifikation: 800 ccm 4%ige Lösung von Chlornatrium in destill. Wasser, 200 ccm 80%iger Alkohol, 40 g Sublimat, 15 ccm Salpetersäure, 5 ccm Eisessig.

KOSTANECKI & SIEDLECKI (Arch. Mikr. Anat. 48. Bd. 1896 p. 184) empfehlen speziell für *Ascaris* ein Gemisch gleicher Theile von 3 %iger Salpetersäure und konzentr. wässeriger Sublimatlösung, dem sie auch wohl noch die Hälfte an absolutem Alkohol zusetzen.

65. Sublimat und Pikrinsäure nach RABL (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 165): gesättigte Lösung von Sublimat in Wasser und von Pikrinsäure in Wasser je 1 Theil, Wasser 2 Theile (s. § 578).

VOM RATH (Anat. Anzeiger 11. Bd. 1895 p. 286) nimmt von kalt gesättigter Lösung von Pikrinsäure und heiss gesättigter Lösung von Sublimat (beide in Wasser) gleiche Theile, dazu $^1/_2$—1 % Eisessig, fixirt die Objekte darin mehrere Stunden lang und bringt sie direkt in Alkohol.

Das **Pikrin-Sublimat-Osmium-Gemisch** desselben Autors wird aus dem vorigen durch Zusatz von 10 % einer 2 %igen Osmiumsäurelösung hergestellt.

FISH (citirt nach Kingsbury in: Trans. Amer. Micr. Soc. Vol. 17 1896 p. 143, 293) verwendet ein Gemisch von 1 g Pikrinsäure, 5 g Sublimat, 10 g Eisessig, 1 Liter Wasser.

MANN (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 480) löst in einer gesättigten Lösung von Sublimat in Kochsalzlösung (von 0.75 %) 1 % Pikrinsäure und nach Belieben auch 1 % Tannin. Ferner braucht er (Anat. Anzeiger 8. Jahrg. 1893 p. 441) auch ein Gemisch von 100 ccm absol. Alkohol, 4 g Pikrinsäure, 15 g Sublimat und 6—8 g Tannin; letzteres soll die zu starke Härtung verhüten.

Weitere Formeln von Mann und Branca s. unten § 109e.

66. Sublimat und Osmiumsäure. DRÜNER (Jena. Zeit. Naturw. 28. Bd. 1894 p. 294) fixirt die Hoden von *Salamandra* in Sublimatosmiumessigsäure (Eisessig, Sublimat und 1 %ige Osmiumsäure je 1, Wasser 20) oder in diesem Gemisch ohne Osmiumsäure.

S. auch oben p. 28 (§ 37) die Formel von Mann, § 65 die von vom Rath und unten § 375 die von Apáthy.

67. Sublimat und Chromsäure. MANN (Verh. Anat. Ges. 12. Vers. 1898 p. 39) empfiehlt für Nervenzellen ein Gemisch gleicher Theile von 5 %iger wässeriger Sublimatlösung und 5 %iger Chromsäure. — Lo BIANCO (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 443): 2 Theile konzentr. wässerige Sublimatlösung und 1 Theil 1 %ige Chromsäure.

68. Sublimat und Kaliumbichromat. In Verbindung mit Essigsäure als **Zenkers Gemisch** bekannt. ZENKER (*Münchener Med. Wochenschr. 24. Jahrg. 1894 p. 534, citirt nach MERCIER in: Zeit. Wiss. Mikr.

11. Bd. 1894 p. 472; dort auch genauere Gebrauchsanweisung) löst 5% Sublimat und 5% Eisessig in Müllers Gemisch, fixirt darin die Gewebe mehrere Stunden, wäscht sie mit Wasser aus und behandelt entweder die Stücke in toto oder die Schnitte mit Jodalkohol. — S. auch RETTERER in: Journ. Anat. Phys. Paris 33. Année 1897 p. 463.

FOÀ (citirt nach: Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 37 1895 p. 287) nimmt gleiche Theile einer gesättigten Lösung von Sublimat in Normalsalzwasser und von Müllers Gemisch oder von 5%iger Lösung von Kaliumbichromat, HOYER (Arch. Mikr. Anat. 54. Bd. 1899 p. 97) 1 Theil 5%ige Lösung von Sublimat und 2 Theile 3%ige Lösung von Kaliumbichromat. — Ueber das Gemisch von KULTSCHITZKY s. oben § 59.

Eine „Mischung von doppeltchromsaurem Kali und Sublimat" hat bereits REMAK (Arch. Anat. Phys. 1856 p. 468) zum Aufbewahren der elektrischen Organe von *Torpedo* benutzt, die vorher „in Sublimatlösung 0,2% oder in Chromsäure 0,2% macerirt" worden waren.

69. Sublimat und Platinchlorid. RABL (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 165) benutzt für Wirbelthiere ein Gemisch von 1 Vol. konzentr. Sublimatlösung, 1 Vol. 1%iger Platinchloridlösung und 2 Vol. Wasser. Genaueres s. in § 578. — LENHOSSÉK (Arch. Mikr. Anat. 51. Bd. 1898 p. 220) empfiehlt für den Hoden von *Mus* ein Gemisch von 20 Theilen 5%iger wässeriger Sublimatlösung, 20 Th. 1%iger Platinchloridlösung und 1 Th. Essigsäure. S. auch § 72 (NIESSING) und § 580 (WINIWARTER).

70. Platinchlorid. Es ist sehr zerfliesslich und wird daher zweckmässig als Lösung in destill. Wasser vorräthig gehalten, etwa zu 10%. (Eine solche und eine 1%ige sind bei Grübler & Hollborn zu haben.)

In die Mikrotechnik wurde es zwar bereits von MERKEL 1870 eingeführt (§ 71), damals aber mit Chromsäure zusammen verwandt. RABL (Morph. Jahrb. 10. Bd. 1884 p. 216) empfahl es dann speziell zum Studium der Karyokinese: er gebraucht eine wässerige Lösung von 1:300, lässt die Objekte 24 Stunden darin, wäscht sie mit Wasser aus und härtet sie in Alkohol.

71. Platinchlorid und Chromsäure oder **Merkels Gemisch** (MERKEL, Macula lutea d. Menschen Leipzig 1870 p. 19): je 1 Theil Platinchlorid und Chromsäure auf 800 Theile Wasser. Da es nur langsam wirkt, so müssen die Objekte mehrere Stunden oder selbst Tage lang darin bleiben. Man wäscht dann mit Alkohol von 50—70% aus. Trotz der Chromsäure färben sich die Objekte vorzüglich. Legt man Thiere, die mit Osmiumsäure fixirt worden sind, einige Stunden lang hinein, so wird die Schwärzung sicher verhindert.

Merkels Gemisch ist besonders gut für zarte Objekte. MERKEL selber lässt es auf Retina 3—4 Tage einwirken; EISIG (Mitth. Z. Stat. Neapel 1. Bd.

1878 p. 341) schreibt für die Seitenorgane der Capitelliden 5—6 Stunden vor und bringt die Objekte dann direkt in Alkohol von 70%; für kleine Hirudineen findet WHITMAN (Methods p. 23) 1 Stunde genug und nimmt dann Alkohol von 50%.

WHITMAN (Methods p. 153) empfiehlt zur Härtung von Fischeiern ein anderes Gemisch nach EISIG, nämlich gleiche Theile von 1/4 %igem Platinchlorid und 1%iger Chromsäure. Die Eier bleiben 1—2 Tage darin.

72. Platinosmiumessigsäure oder **Hermanns Gemisch.** HERMANN (Arch. Mikr. Anat. 34 Bd. 1889 p. 59) erhielt ausgezeichnete Resultate, als er in Flemmings starkem Gemisch (§ 46) die Chromsäure durch 1%iges Platinchlorid ersetzte und die übrigen Bestandtheile entweder unverändert liess oder von der Osmiumsäure nur die Hälfte nahm. Also: 15 Theile 1%ige Platinchloridlösung, 1 Theil Eisessig und 4 (für Säugethiere, für *Salamandra* aber nur 2) Theile 2%ige Osmiumsäure. So blieben die Plasmastrukturen besser erhalten als mit Flemmings Gemisch.

Nachbehandlung und Tinktion wie bei Flemmings Gemischen. Auch die Bemerkungen über das Verderben des Gemisches (§ 46) gelten hier in gleichem Maasse.

RENGEL (Zeit. Wiss. Z. 63. Bd. 1898 p. 454) behandelt die Schnitte, um die Färbbarkeit (besonders die der Kerne) zu erhöhen, 1/2—1 Stunde lang mit konzentr. wässeriger Lösung von Pikrinsäure.

Meine (LEE) vielen Erfahrungen mit Hermanns Gemisch gestatten mir das Urtheil, dass es die Objekte weniger färbt und mitunter auch zarter fixirt, als Flemmings Gemische. Da es aber letzteren nicht immer überlegen und so sehr theuer ist, so liegt, glaube ich, kein guter Grund dafür vor, es im Allgemeinen an die Stelle von Flemmings Gemischen treten zu lassen.

Nach FISCHER (Fixirung etc. p. 29) hat Hermanns Gemisch die Eigenschaften des Flemmingschen in erhöhtem Maasse.

NIESSING (Arch. Mikr. Anat. 46. Bd. 1895 p. 147) giebt zwei Modifikationen von Hermanns Gemisch an: 1) Platinchlorid in 10%iger Lösung 25, Osmiumsäure in 2%iger Lösung 20, Eisessig 5, Wasser 50 Theile; 2) dasselbe, aber statt Wasser gesättigte Sublimatlösung. — S. auch unten § 109 f) BOUIN.

73. Ueber **Platinchlorid,** Osmiumsäure und Kaliumbichromat nach Lindsay s. oben § 57, über Platin- und Iridiumchlorid unten § 75.

74. Palladiumchlorür ($PdCl_2$) wurde zuerst von SCHULZE (Arch. Mikr. Anat. 3. Bd. 1867 p. 477) empfohlen, weil es die Gewebe besser härte als Chromsäure oder Müllers Gemisch, ferner Organe mit vielem Bindegewebe leicht durchdringe und die Gewebe in verschiedenen Tönen von Braun färbe. SCHULZE hält eine 1%ige Lösung vorräthig, braucht aber eine viel schwächere (1 : 800) und säuert sie absichtlich mit Salzsäure etwas an.

Cattaneo (Boll. Sc. Pavia 1883 No. 3 u. 4) verwendet es für Infusorien in Lösungen von 1 : 300 oder 600 oder 800 nur 1—2 Minuten lang. — Frenkel (Anat. Anzeiger 8. Jahrg. 1893 p. 539) braucht für Bindegewebe ein Gemisch von 15 Theilen 1%iger Lösung von Palladiumchlorür, 5 Theilen 2%iger Osmiumsäure und einigen Tropfen Essigsäure.

Das Salz ist fest, aber bei Grübler & Hollborn auch in 10%iger Lösung zu haben.

75. **Iridiumchlorid** wird von Eisen (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 195) zum Fixiren der Gewebe oder Embryonen und Larven von Salamandern empfohlen: $^1/_2$%ige Lösungen von Platinchlorid und Iridiumchlorid je 50 Theile, Eisessig 1 Theil; oder noch besser: Iridiumchlorid in $^1/_2$ oder $^1/_5$%iger Lösung 100 Theile, Eisessig 1 Theil. Zum Auswaschen in destillirtem Wasser genügen einige Stunden. Die Objekte sind durchaus gleichmässig fixirt, nicht brüchig, nach dem Waschen rein weiss und färben sich gut.

Ich (Lee) finde, das I. fixirt (natürlich für sich allein, ohne Platinchlorid) überhaupt nicht.

76. **Eisenchlorid** nach Fol (Zeit. Wiss. Z. 38. Bd. 1883 p. 491). Die Tinct. ferri perchlorati (Eisenchlorid in Alkohol von etwa 60%) der englischen Pharmakopoe, mit Wasser auf etwa 2% verdünnt, dient zum Fixiren von allerlei Arten schwimmender Seethiere (Medusen, Salpen, Heteropoden etc.). Man wäscht zunächst mit neutralem, dann zur Auflösung des Eisensalzes mit angesäuertem (etwas Salzsäure) 70%igem Alkohol aus (oder lässt das Eisen in den Geweben und bringt es durch Zusatz einer Spur von Gallussäure zum Alkohol erst recht zur Geltung). — Später (Lehrbuch p. 102) empfiehlt Fol zum Fixiren von Cilien und Pseudopodien, aber auch von pelagischen Seethieren, die obige Tinktur mit dem 5—10fachen Volumen an 70% igem Alkohol zu verdünnen (falls ein Niederschlag auftritt, etwas Salzsäure hinzufügen!) und die damit fixirten Objekte, die aber nur recht klein sein dürfen, in 50%igem Alkohol mit $^1/_2$—1% Oxalsäure auszuwaschen.

Den Liquor ferri sesquichlorati der deutschen Pharmakopoe, mit der 3—4fachen Menge von Alkohol oder Wasser verdünnt, nimmt Platner (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 187) zum Fixiren von markhaltigen Nerven.

77. **Zinkchlorid.** Gilson (La Cellule Tome 6 1890 p. 122) empfiehlt für die Spinndrüsen der Lepidopteren ein Gemisch aus je 5 Theilen Eisessig und Salpetersäure, 20 Theilen Chlorzink, 100 Theilen Alkohol von 80% und 300 Theilen Wasser.

Ueber Zinkchlorid zum Härten von Gehirnen s. unten § 681 und 682.

78. Ueber **Kobaltchlorid** s. § 877 (Pianese), über **Kupferchlorid** und **Kupferacetat** oder **-nitrat** § 85, über **Zinksulfat** in Verbindung mit Kupfersulfat § 79.

79. **Kupfersulfat.** Lo Bianco (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 442, 443) verwendet es zum Fixiren von Seethieren entweder rein in 5—10%iger Lösung oder als Gemisch: 10 Theile einer 10%igen Lösung mit 1 Theil konzentr. Sublimatlösung. Man muss aber die Thiere mit Süsswasser gut auswaschen,

sonst treten in ihnen leicht Niederschläge auf. — S. ferner § 866, wo auch die Verwendung mit Zinksulfat angegeben ist. — Ueber Kupfersulfat für Embryonen nach Remak s. § 594, über dasselbe mit Osmiumsäure für elastisches Gewebe § 777, über dasselbe mit Kaliumbichromat oben § 59.

80. Alaun ist auch zum Fixiren verwandt worden. Nach ausgedehnten Versuchen nenne ich (Lee) ihn aber nur, um dringend vor seinem Gebrauch zu warnen.

81. Essigsäure. Der Ehrenplatz unter den organischen Säuren in ihrer Eigenschaft als Fixirmittel für die Zellkerne gebührt wohl mit Recht der Essigsäure. Nach Flemming (Zellsubstanz p. 183) wirkt sie nach dieser Richtung hin am besten in einer Stärke von $^1/_5$—1%.

Als Fixirmittel für das Zellplasma ist sie hingegen nicht ohne Weiteres zu brauchen, am ehesten noch halb oder sogar ganz konzentrirt, wie sie wohl zuerst van Beneden für sehr kontraktile Thiere (viele Würmer, Cölenteraten und Nudibranchier) angewendet hat. Denn sie tödtet diese äusserst rasch und meist auch völlig ausgestreckt. Im Allgemeinen verfährt man dabei so: man giesst Eisessig in reichlicher Menge über die Thiere, lässt sie davon durchdringen — das ist in einigen Minuten geschehen, denn die starke Säure dringt sehr leicht ein — und wäscht sie dann sofort in immer stärkerem Alkokol (von 30%igem oder auch 50%igem an) unter häufigem Wechsel desselben aus. Hierbei besorgt der Alkohol die eigentliche Härtung, und man muss daher auch darauf gefasst sein, dass er in den nur fixirten Geweben Schrumpfungen veranlasst. Weitaus besser ist deswegen der Zusatz einer schon selber härtenden Säure, z. B. Osmium- oder Chromsäure.

Johnson (in litt.) hat als eins der besten Mittel für die Fixirung der Retina ein Gemisch von gleichen Theilen Eisessig und 2%iger Osmiumsäure ausprobirt. - Lo Bianco (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 443) fügt zur 50%igen Essigsäure $^1/_{10}$ einer 1%igen Chromsäure und findet, dass sogar diese geringe Menge erheblich der erweichenden Wirkung der Essigsäure entgegenarbeitet (seine Chromessigsäure No. 2; s. auch § 42).

Am sichersten aber geht man, wenn man die Essigsäure nur zur Fixirung der Kerne für temporäre (etwa gleich hinterher mit Methylgrün zu färbende und zu studirende) Präparate anwendet. Abgesehen hiervon spielt sie bekanntlich in sehr vielen Fixirgemischen eine wichtige Rolle, wenngleich diese sich oft wohl nur auf die Hervorbringung einer deutlich sauren Reaktion beschränkt. (S. hierüber die ausführliche Darlegung bei Fischer, Fixirung etc. p. 9—11.)

Die Autoren sind bei der Angabe ihrer Vorschriften nur selten so genau, wie zu wünschen wäre; dies ist auch mit der Essigsäure der Fall. Eisessig

ist die 100%ige Essigsäure, während die konzentr. Essigsäure der deutschen Pharmakopoe nur 96% enthält. Was Lo Bianco (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 441) im Gegensatze zum Eisessig als konzentrirte Essigsäure bezeichnet, ist aber nur nahezu 49%ige mit dem spez. Gewicht von 1.060.

82. Essigsäure und Alkohol (Carnoy in: La Cellule Tome 3 1887 p. 6; ibid. p. 276; van Benedfn & Neyt in: Bull. Acad. Belg. (3) Tome 14 1887 p. 218; Zacharias in: Anat. Anzeiger 3. Jahrg. 1888 p. 24; van Gehuchten ibid. p. 237). Carnoy giebt für dies wichtige Mittel zwei Formeln an: Eisessig 1 Theil, absoluter Alkohol 3 Theile; und: Eisessig 1 Theil, absoluter Alkohol 6 Theile, Chloroform 3 Theile. Das Chloroform soll die Wirkung des Gemisches beschleunigen. — van Beneden & Neyt nehmen gleiche Theile absoluten Alkohol und Eisessig. — Zacharias verwendet Eisessig 1 Theil, absoluten Alkohol 4 Theile, und auf je 10 ccm dieses Gemisches 2—3 Tropfen 1%iger Osmiumsäure (van Gehuchten findet diesen Zusatz überflüssig).

Essigsäure und Alkohol bilden eines der raschesten und am besten eindringenden Gemische. Es fixirt die Kerne gut und erlaubt auch ausgezeichnete Färbungen von jedweder Art. Erdacht wurde es von allen obigen Autoren eigens zum Studium der Karyokinese in den Eiern von *Ascaris* — diese sind als schwierig zu fixirendes Objekt berühmt geworden — ist aber auch für andere Objekte brauchbar. Man wäscht die fixirten Gewebe mit Alkohol aus und behandelt sie dann nach Belieben weiter; jedoch thut man gut daran, Wasser nach Möglichkeit zu vermeiden. Um die Quellung der Gewebe durch die Essigsäure ganz zu verhindern, wird dem obigen Gemische neuerdings noch Sublimat hinzugefügt (§ 83).

83. Essigsäure, Alkohol und Sublimat. Carnoy & Lebrun (La Cellule Tome 13 1897 p. 64) verwenden für *Ascaris* auf Veranlassung von Gilson eine konzentrirte Lösung von Sublimat in gleichen Maasstheilen von Eisessig, absolutem Alkohol und Chloroform. Genaueres s. in § 632; s. auch oben § 62d.

84. Ameisensäure lässt sich verdünnt ebenso gebrauchen, wie Essigsäure (§ 81). Vielleicht könnte man sie konzentrirt gleichfalls an die Stelle der Essigsäure treten lassen, aber uns sind keinerlei Versuche hierüber bekannt. — Ueber ihr Gemisch mit Chromsäure s. § 43.

85. Kupferacetat und Kupferchlorid oder Gemisch von Ripart & Petit (Carnoy, Biol. cellulaire 1884 p. 94): Kampherwasser (nicht gesättigt) 75, dest. Wasser 75, Eisessig 1, Kupferacetat und Kupferchlorid je 0,30 g.

Aehnlich ist das Gemisch von Tempère (s. Behrens, Tabellen 3. Aufl. 1898 p. 72): Wasser 99, Eisessig 1 ccm, Phenol 1 g, Kupferchlorid und Kupfernitrat je 0,2 g.

Was in beiden Gemischen, von denen das zweite ausschliesslich, das erste ursprünglich für zarte niedere Pflanzen ausgedacht worden ist, eigentlich wirkt, ist unklar. Offenbar eignen sie sich nur für temporäre Präparate, die man so frisch wie möglich in wässerigen Medien untersuchen möchte; solche färben sich augenblicklich und vorzüglich mit Methylgrün. Zur Erhöhung der fixirenden Kraft kann man den Gemischen Osmiumsäure zusetzen. Für cytologische Untersuchungen sind sie werthvoll. Der Kampher kann übrigens durch einen Kristall von Thymol ersetzt werden.

Duboscq (Arch. Z. Expér. (3) Tome 6 1899 p. 484) fixirt, färbt und untersucht das Blut von Chilopoden in einem Gemisch gleicher Theile von 1%iger Osmiumsäure, 1%iger wässeriger Lösung von Thionin und 1%iger Essigsäure; in letzterer sind aber vorher Kupferacetat und Kupferchlorid zu je 1% gelöst worden.

86. Kupferacetat und Osmiumsäure. De Waele (Livre jubil. Ch. van Bambeke Bruxelles 1899 p. 40) legt zum Nachweis von Zucker den Darm von *Rana* (nach Fütterung mit Dextrose) bei 65° C. auf ½ Stunde in ein Gemisch von 10 Theilen 5%iger Kupferacetatlösung und 1 Theil 2%iger Osmiumsäure, dann auf einige Zeit in Hermanns Gemisch. (Die schwarzen Kügelchen, die sich auf den Schnitten im Epithel zeigen, sollen durch das Kupfer reduzirter Zucker sein).

87. Uranacetat nach Schenk (Mitth. Embr. Inst. Wien 2. Bd. 1882 p. 95; Gilson in: La Cellule Tome 1 1885 p. 141). Es kommt in seinen Eigenschaften der Pikrinsäure sehr nahe, fixirt zart und dringt sehr gut ein, ist also vielleicht für Arthropoden gut. Auch giebt es mit Methylgrün keinen Niederschlag. Ueber U. mit Osmiumsäure s. § 37 (Kolossow).

88. Bleiacetat dient zum Härten von Gehirnen. S. § 678.

89. Pikrinsäure (Trinitrophenol). Die Pikrinsäure in wässeriger Lösung muss stark angewandt werden, wenn man die Elemente in situ erhalten will, da schwache Lösungen maceriren; schwache sind also gut für Dissoziationen oder zum Fixiren isolirter Zellen. Nach Flemming (Zellsubstanz p. 380) erhalten aber beiderlei Arten die Kernfiguren gleich gut. Gewöhnlich nimmt man eine kalt gesättigte Lösung (etwa 1 : 80, bei 100° jedoch 1 : 25) und lässt die Objekte je nach der Grösse einige Sekunden bis 24 Stunden darin; für Infusorien genügen 1—2 Minuten, während Objekte von mehreren Millimetern Dicke 3—6 Stunden brauchen.

In Uebereinstimmung mit Anderen finde ich (Mayer), dass bei 20° Wasser über 1 % Pikrinsäure löst. Der grösseren Genauigkeit wegen habe ich vorgeschlagen, eine Lösung von bestimmten Gehalte (½ %) zu verwenden (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 24).

Die Säure muss stets mit Alkohol ausgewaschen werden, denn Wasser schadet den mit ihr behandelten Geweben. Deswegen vermeide man auch bei allen übrigen Manipulationen das Wasser und färbe in alkoholischen Flüssigkeiten (Parakarmin, Boraxkarmin, Hämacalcium), mit alleiniger Ausnahme vielleicht der wässerigen Färbemittel, die selber etwas härten, wie Hämalaun, Karmalaun u. s. w. Dagegen ist einer der Vortheile der Pikrinsäure der, dass sie aus jeglichem Gewebe mit Alkohol sicher entfernt werden kann, wenn man nur lange genug damit wäscht.

Fol (Lehrbuch p. 102) wäscht mit Alkohol von 60—70 % bei 40° C. aus. Bei Färbung mit Karmalaun und Parakarmin ist übrigens eine völlige Entfernung der Pikrinsäure vorher nicht nöthig.

Nach Jelinek (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 242) geht die Pikrinsäure viel leichter aus den Geweben heraus, wenn man dem Alkohol eine Base zusetzt. J. gibt einige Tropfen konz. wässeriger Lösung von Lithiumkarbonat zum Alkohol; ein leichtes Präzipitat entsteht, und wenn man nun in den trüben Alkohol die Objekte bringt, so wird er wieder in dem Maasse, wie die Pikrinsäure ausgezogen wird, klar und gelb. Man fährt damit fort, bis die Gewebe nicht mehr gelb sind.

Sehr oft, ja vielleicht sogar immer, verwendet man vortheilhaft die Pikrinsäure nicht allein, sondern im Gemisch mit stärkeren Säuren (s. § 91 ff.).

In Alkohol gelöst braucht die Pikrinsäure Gage (Proc. Amer. Soc. Micr. Vol. 12 1890 p. 120; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1891 p. 418): Alkoho von 95 % und Wasser je 250, Pikrinsäure 1 Theil. Er fixirt darin etwa 24 Stunden lang, wäscht ebenso lange in Alkohol von 67—70 % und dann noch 24 Stunden lang in Alkohol von 75—82 % aus. S. auch § 65.

90. Pikrinosmiumsäure. Flemming (Zellsubstanz p. 381) hat Gemische versucht, worin sich an Stelle der Chromsäure in den Chromosmiumgemischen (§ 45 und 46) Pikrinsäure befindet. Die Kerne wurden damit ebenso gut fixirt, färbten sich aber schwieriger. — vom Rath (Anat. Anzeiger 11. Bd. 1895 p. 289) giebt zu 100 ccm gesättigter Lösung von Pikrinsäure 6 ccm einer 2 %igen Lösung von Osmiumsäure und 1 ccm Eisessig.

91. Pikrinchromsäure nach Fol (Lehrbuch p. 100): gesättigte Lösung von Pikrinsäure in Wasser 10 Raumtheile, 1 %ige Chromsäurelösung 25 und Wasser 65 Raumtheile. Unmittelbar vor dem Gebrauch mag man „noch etwa 0.005 Osmiumsäure“ zusetzen, um die Wirkung energischer zu machen. Auswaschen mit heissem Wasser (fast kochendes ist am besten) und dann mit Alkohol. Fol sagt, dies Mittel härte Gewebe ausserordentlich gut und verhindere die Färbung gar nicht, dringe aber nicht tief ein und fixire nur langsam.

92. Pikrinschwefelsäure (Kleinenberg in: Foster & Balfour, Elements of Embryology London 1874 p. 246 und in: Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 19 1879 p. 208; Mayer in: Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 2 und in: Amer. Natural. Vol. 16 1882 p. 698). Dieses vor 2 Dezennien sehr gerühmte, neuerdings aber ziemlich in Vergessenheit gerathene Fixirmittel existirt in mehreren Varianten. Kleinenberg nämlich fügt zu 100 Raumtheilen einer gesättigten Pikrinsäurelösung in Wasser 2 Raumtheile Schwefelsäure hinzu, filtrirt von dem reichlichen Niederschlag ab und verdünnt dann mit dem dreifachen Volum Wasser. Ferner empfiehlt er den Zusatz von so viel Kreosot aus Buchenholztheer, wie sich lösen will, und neuerdings (Zeit. Wiss. Z. 44. Bd. 1886 p. 25) auch von 2% Chlornatrium, um Schrumpfungen bei den Larven von *Lopadorhynchus* zu vermeiden. Das Kreosot soll Schwellungen verhüten. Nach Fol (Lehrbuch p. 100) lässt sich dies durch Zusatz von 1/3 Volum 1%iger Chromsäure erzielen. — Wistinghausen (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1891 p. 47) hingegen fügt zu 100 Vol. gesättigter Lösung von Pikrinsäure 300 Vol. Wasser und 2 Vol. Schwefelsäure, behält also alle Pikrinsäure im Gemisch. — Mayer sättigt eine 2%ige Schwefelsäure (100 Vol. destill. Wasser, 2 Vol. konzentr. Schwefelsäure) mit Pikrinsäure, von der sich aber nur etwa 1/4%, also viel weniger als in reinem Wasser löst. Dies ist die konzentrirte Pikrinschwefelsäure, und aus ihr wird durch Verdünnen mit dem dreifachen Quantum Wasser die gewöhnliche P. erhalten. — Langenbeck (Journ. Morph. Boston Vol. 14 1898 p. 303) endlich nimmt zur Herstellung von „Kleinenberg's picro-sulphuric solution" Seewasser und wird daher wohl noch weniger Pikrinsäure darin haben.

Von obigen Gemischen wird gewöhnlich das von Kleinenberg angewandt und das starke Mayersche nur für spezielle Objekte, besonders Arthropoden benutzt. Das Umgekehrte dürfte aber richtiger sein. Die Behandlung der Objekte ist übrigens in beiden Fällen gleich: man lässt sie 3 oder mehr Stunden in der Flüssigkeit, bringt sie dann sofort auf 5—6 Stunden in Alkohol von 70%, endlich in solchen von 90%, der so oft gewechselt wird, bis die gelbe Farbe ganz verschwunden oder wenigstens viel heller geworden ist. Warmer Alkohol zieht die Säure viel rascher aus als kalter. Das Auswaschen mit Wasser ist entschieden zu verwerfen.

Held (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. 1897 p. 227) wäscht die Pikrinschwefelsäure aus Nervengewebe entweder zunächst mit fliessendem Wasser oder mit Alkohol von 20, 30 etc. % oder endlich mit Aceton „von gleicher prozentiger Stufe" aus; in letzterem schrumpfen die Objekte weniger als in Alkohol.

Die Vorzüge der Pikrinschwefelsäure bestehen darin, dass sie die Gewebe sehr rasch tödtet, sehr gut eindringt, sich aus den Geweben mit Alkohol völlig entfernen lässt (viel leichter als die reine Pikrinsäure) und diese auch für die Färbung in geeignetem Zustande lässt. Sie hat aber wohl noch grössere Nachtheile (die Schwefelsäure bringt bei Vertebraten das Bindegewebe zum Quellen; aus Gewebe mit viel Kalk löst sie diesen und schlägt ihn dann als Gips darin nieder etc.) und ist daher jedenfalls für feinere Untersuchungen nicht empfehlenswerth.

93. Pikrinsalpetersäure nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 5): Wasser 100, Salpetersäure von 25% N_2O_5 5 Volumina, dazu Pikrinsäure bis zur Sättigung.

Wird unverdünnt angewandt. Wirkt ähnlich der Pikrinschwefelsäure, gewährt aber den Vortheil, dass sich kein Gips bildet, hat dagegen den Nachtheil, dass sie sich mit Alkohol allein nur viel langsamer auswaschen lässt. LIST (Arch. Entwickelungsmech. 8. Bd. 1899 p. 623) setzt daher zum 90%igen Alkohol 2% Salpetersäure zu und findet, dass die P. auf diese Weise rasch aus den Geweben herausgeht.

Nach MAYER (Whitman, Methods p. 22) fixirt die P. Eier mit viel Dotter, z. B. von *Palinurus*, besser als Salpetersäure, Pikrinsäure oder Pikrinschwefelsäure es thun. Ohne Zweifel ist sie der Pikrinschwefelsäure weit überlegen.

94. **Pikrinchromsalpetersäure** nach RAWITZ (Leitfaden 2. Aufl. p. 24): 1 Vol. Pikrinsalpetersäure und 4 Vol. 1%ige Chromsäure. Nach 24 Stunden mit 70%igem Alkohol auszuwaschen. Für Zelltheilungen bei *Salamandra*.

95. **Pikrinosmiumsalpetersäure** nach RAWITZ (Leitfaden 1. Aufl. p. 16; 2. Aufl. p. 24): 6 Vol. (in der 1. Auflage: 3 Vol.) Pikrinsalpetersäure und 1 Vol. 2%ige Osmiumsäure. Nach 1/2—3 Stunden auswaschen in 70%igem Alkohol. Für sehr zarte Gewebe.

96. **Pikrinsalzsäure** nach MAYER (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 5): Wasser 100, Salzsäure von 25% HCl 8 Volumina, dazu Pikrinsäure bis zur Sättigung. Wird unverdünnt angewandt, wirkt ähnlich der Pikrinsalpetersäure.

97. **Pikrinessigsäure** nach BOVERI (Jena. Zeit. Naturw. 21. Bd. 1887 p. 433): konzentr. Lösung von Pikrinsäure 100, Wasser 200, Eisessig 3 Vol. Für die Eier von *Ascaris*. Auswaschen mit Alkohol von 70%. — Nach DAVIDOFF (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1889 p. 118): 3 Theile konzentr. Lösung von Pikrinsäure, 1 Theil Eisessig. Für die Eier von Tunikaten. Nachbehandlung ebenso. — Nach BOUIN (Arch. Anat. Micr. Paris Tome 1 1897 p. 229): 15 Theile gesättigte Pikrinsäurelösung, 5 Theile Formol und 1 Theil Essigsäure. Für die Hoden von *Cavia*. S. hierzu auch GARNIER (Bibliogr. Anat. Paris Tome 5 1898 p. 279). — Ueber Pikrinessigsäure mit Osmiumsäure s. § 90.

98. **Pikrinplatinchlorid** und **Pikrinosmiumplatinchlorid** nach VOM RATH (Anat. Anzeiger 11. Bd. 1895 p. 282, 285): 200 ccm gesättigte Lösung von Pikrinsäure, 1 g Platinchlorid (in 10 ccm Wasser gelöst) und 2 ccm Eisessig; eventuell dazu 25 ccm (oder nur 12 ccm) einer 2%igen Lösung von Osmiumsäure.

Ueber ein Gemisch von Pikrinsäure, Platinchlorid, Formol und Ameisensäure s. BOUIN (Bibliogr. Anat. Paris Tome 6 1898 p. 54).

Ueber **Pikrinsäure** mit **Sublimat** s. § 65, über **Salicylsäure** § 102.

99. **Alkohol.** Zum Fixiren wird der Alkohol im Allgemeinen nur in 2 Stärken mit Vortheil gebraucht: als sehr schwacher und als absoluter. Der absolute gehört unter die Fixirmittel, weil er so rasch tödtet und härtet, dass die Gewebe trotz der unvermeidlichen energischen Entwässerung ihre Form nicht mehr ändern können.

Schwacher Alkohol andererseits gehört auch hierher, weil er gerade noch energisch genug koagulirt und zugleich in Folge seines Wassergehaltes nur schwach und unschädlich entwässert. Die Stärken dazwischen (90 %, 70 %, 50 %) erfüllen diese Bedingungen nicht und sind daher an und für sich zum Fixiren nicht geeignet, können aber in Verbindung mit anderen Fixirmitteln (Sublimat, Salpetersäure, Essigsäure) dadurch sehr nützlich werden, dass sie deren Vermögen, leicht in die Gewebe einzudringen, bedeutend erhöhen. Hierfür ist wohl 70 %iger am besten.

Tellyesniczky (Arch. Mikr. Anat. 52. Bd. 1898 p. 219) und Fischer (Fixirung etc. p. 18) urtheilen Beide über den Alkohol ungünstig. Jener betont vor Allem, freilich ohne damit etwas Neues zu sagen, die Erscheinung, dass die Kerne (und in ihnen wieder das Chromatin) und das Plasma sich von der Peripherie des fixirten Objektes — des Hodens von *Salamandra!* — nach dem Centrum zu gedrängt haben, gerade als wollten sie sich vor dem Alkohol flüchten; und dies gilt nach T. sowohl vom 70%igen als auch vom absoluten. Indessen muss T. diese Behauptung doch selber dahin einschränken, dass die „auffallende Zerstörungskraft“ des Alkohols sich bei anderen Organen und anderen Thieren nicht zeige. Und damit trifft T. das Richtige: wenn der Alkohol nicht rasch überall eindringt, so verursacht er die oben geschilderten Verzerrungen; sonst jedoch fixirt er, besonders wenn die Gewebe nicht excessiv wässerig sind, die Form der Zellen und Kerne sehr getreu. Dies thut sogar der 30%ige, wenn er z. B. auf dünne Membranen (von nur wenigen Zellschichten) angewandt wird. Wie viel er vom Inhalte der Zellen niederschlägt oder gelöst lässt oder gar erst auflöst, das hängt offenbar in erster Linie von der Art des Inhaltes ab und kann daher nur von Fall zu Fall entschieden werden. Hier nun setzt mit mehr Recht die Kritik von Fischer ein; sein Urtheil lautet, der Alkohol werde, da er die meisten Eiweisskörper koagulire, wohl „dauerhafte Artefakte liefern“, dagegen die im Leben ganz oder halb gelösten Verbindungen der Nucleïnsäure mit Albumosen nicht erhalten können.

Wie zum Fixiren, so ist auch zum Härten der Alkohol für sich allein weniger geeignet als die meisten oben besprochenen Mittel; braucht man ihn aber mit Verstand, um die Wirkung eines guten Fixirmittels zu vervollständigen, so leistet er sehr gute Dienste. Man beginne mit schwachem (in der Regel 70 %igem) und verstärke ihn allmählich, nehme auch immer grosse Mengen und wechsle ihn häufig oder hänge das Objekt oben in der Flüssigkeit auf, sodass es stets von reinem Alkohol umgeben bleibt, während das Wasser und die Extraktivstoffe des Objektes sich zu Boden senken. Zum Härten grosser Stücke braucht man oft viele Wochen, während kleine, leicht durchdringbare, wie Schleimhäute, schon in 24 Stunden hart genug werden können. — Auch wenn er schon ganz klar und farblos bleibt,

ist es gut, ihn nochmals zu wechseln, ehe man die Objekte längere Zeit darin aufhebt.

Es wird lange nicht genug darauf geachtet, ob der Alkohol auch rein sei. Für gewöhnliche Zwecke — um ganze Thiere zu konserviren etc. — mag nicht viel darauf ankommen, wohl aber, wenn es sich um histologische Feinheiten handelt. Reiner Alkohol darf beim Abdampfen nur äusserst wenig festen Rückstand liefern, darf zwischen den Händen verrieben nach seiner Verdunstung keinen starken Geruch hinterlassen, darf endlich weder sauer noch alkalisch reagiren. Man prüfe die Reaktion mit empfindlichem Lakmuspapier, das man eventuell einige Stunden darin liegen lässt. Eine noch genauere Probe gibt MAYER (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1891 p. 180) an: eine Lösung von je 1 g Hämateïn und Chloraluminium in 100 ccm Alkohol darf, im Verhältniss von 1 : 100 dem zu prüfenden Alkohol zugesetzt, auch nach 24 Stunden noch nicht ausgefällt sein.

Tabelle zum Verdünnen des Alkohols.

Sie gibt an, wie viele Raumtheile Wasser man zu 100 Raumtheilen Alkohol von der ursprünglichen Stärke (in der Tabelle rechts) setzen muss, um die gewünschte Stärke (in der Tabelle links) zu erhalten. Z. B. um Alkohol von 60% zu machen, muss man zu 100 ccm von 90%igem nahezu 54 ccm Wasser setzen, zu 100 ccm von 70%igem nur reichlich 17 ccm. — Die Angaben von REDENBAUGH (Z. Bull. Boston Vol. 1 1898 p. 245) sind ungenau.

Gewünschte Stärke in Prozenten	Spezif. Gew. bei 15° C.	Ursprüngliche Stärke in Prozenten								
		90 0·833	85 0·849	80 0·863	75 0·876	70 0·889	65 0·901	60 0·913	55 0·923	50 0·933
85	0·849	6·56								
80	0·863	13·79	6·83							
75	0·876	21·89	14·48	7·20						
70	0·889	31·05	23·14	15·35	7·64					
65	0·901	41·53	33·03	24·66	16·37	8·15				
60	0·913	53·65	44·48	35·44	26·47	17·58	8·76			
55	0·923	67·87	57·90	48·07	38·32	28·63	19·02	9.47		
50	0·933	84·71	73·90	63·04	52·43	41·73	31·25	20·47	10·35	
45	0·943	105·34	93·30	81·38	69·54	57·78	46·09	34·46	22·90	11·41
40	0·951	130·80	117·34	104·01	90·76	77·58	64·48	51·43	38·46	25·55
35	0·958	163·28	148·01	132·88	117·82	102·84	87·93	73·08	58·31	43·59
30	0·965	206·22	188·57	171·05	153·61	136·04	118·94	101·71	84·54	67·45

100. Absoluter Alkohol. Ueber seine Wirkung, besonders sein schnelles Eindringen in die Gewebe, s. oben p. 57. Nach MAYER (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 7) bietet siedender absoluter Alkohol oft die einzige Möglichkeit, gewisse Arthropoden so rasch zu tödten, dass die Maceration vermieden wird, die mit kaltem Alkohol eintreten würde (speziell bei Tracheaten). Auch BRÜEL (Z. Jahrb. Abth. Morph. 10. Bd. 1897 p. 569) verwendet heissen Alkohol und besteht darauf, dass es wirklich absoluter sei, da schon 99%iger oft empfindliche Schrumpfungen herbeiführe.

Wichtig ist es, zum Fixiren relativ viel Alkohol zu verwenden. Zum Aufbewahren nehme man Alkohol von 90 % oder weniger.

Der absolute Alkohol, wie er im Handel vorkommt, ist beim Gebrauch fast unmöglich absolut zu halten, da er an der Luft rasch Wasser anzieht. FOL (Lehrbuch p. 104) empfiehlt deswegen, kaustischen Kalk in Stücken hinein zu thun. — RANVIER bereitet ihn sich für die Praxis absolut genug, indem er 95%igen mit gebranntem Kupfersulfat behandelt: er lässt ihn damit unter öfterem Schütteln 1—2 Tage in Berührung, giesst ihn dann ab, gibt eine neue Menge des Kupfersalzes hinzu, und thut dies so oft, bis dies nicht mehr merklich blau wird, oder bis man beim Vermischen eines Tropfens Alkohol mit ebenso viel Terpentinöl unter dem Mikroskop keine Wassertheilchen mehr sieht. Das Kupfersulfat calcinirt man in einer Porzellanschale über einer Flamme so lange, bis es weiss wird, und pulverisirt es dann (Proc. Acad. N. Sc. Philadelphia f. 1884 p. 27; Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 4 1884 p. 322 und 984). Uebrigens ist Kupfersulfat im absol. Alkohol doch nicht ganz unlöslich.

Als einfaches Mittel zur Erkennung von Wasser in absolutem Alkohol empfiehlt YVON (C. R. Acad. Sc. Paris Tome 125 1897 p. 1181) den Zusatz groben Pulvers von Calciumcarbid: auch eine Spur Wasser ruft die Entwickelung von Acetylengas hervor, und beim Umschütteln wird der Alkohol durch das entstandene Kalkhydrat trübe.

101. Drittel-Alkohol oder Ranviers Alkohol besteht nach RANVIER (Arch. Phys. Norm. Path. Paris (2) Tome 1 1874 p. 782; Traité 1. Ed. 1875 p. 241; 2. Ed. 1888 p. 68) aus 2 Theilen Wasser und 1 Theil Alkohol von 90 % (36° Cartier). Der Alkohol muss aber genau diese Stärke haben, denn seine Wirkung hängt davon wesentlich ab. Man lässt die Objekte 24 Stunden darin, länger nur, wenn man sich um die nach dieser Zeit eintretende Maceration nicht zu kümmern braucht. Der Drittel-Alkohol ist ein mildes Fixirmittel. Er härtet so wenig, dass er sich nur selten für Objekte eignet, die geschnitten werden sollen. Hauptsächlich dient er für rasche Macerationen, ist aber auch für dünne Membranen zum Fixiren der Form der Zellen und Kerne unter Umständen geeignet (s. p. 58). Solche Objekte bringt

man später allmählich in starken Alkohol und erst von da in ein Färbgemisch. Bei Macerationen färbt man hingegen meist direkt, z. B. mit Methylgrün, ohne vorherige Härtung.

102. Eine konzentrirte Lösung von **Salicylsäure** in **Drittelalkohol** soll nach Heidenhain (Arch. Mikr. Anat. 54. Bd. 1899 p. 186) im Darm von *Rana* das Mucin fällen und die Zellen „glänzend konserviren".

103. Saurer Alkohol (Mayer in: Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 7). Zu 97 Vol. 90%igem Alkohol setzt man 3 Vol. reine Salzsäure oder Salpetersäure und löst ein wenig Pikrinsäure darin auf. In dem Gemisch lässt man die Objekte (Seethiere) nur so lange, bis man sicher weiss, dass sie gut damit durchtränkt sind, und wäscht sie dann in 90%igem Alkohol aus. Dabei zeigt das Verschwinden der gelben Farbe an, dass alle Säure aus den Objekten entfernt ist.

Das Gemisch soll nur für gröbere Objekte dienen, die man für Museen in Alkohol aufheben will, und die Säure soll dabei sowohl das Verkleben der Organe durch die Körpersäfte, das in neutralem Alkohol oft eintritt, als auch die Bildung von Niederschlägen verhindern, die sich aus dem Seewasser au die Oberfläche der Objekte ausscheiden könnten und dann nicht nur dem Alkohol, sondern auch später den Färbmitteln das Eindringen erschweren würden. Uebrigens verliert die Säure nach einiger Zeit merklich an Kraft, da sich auf ihre Kosten Aether bilden. Statt des Alkokols von 90% kann man auch, obwohl nicht so gut, den von 70% ansäuern. — Lo Bianco (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 443) verwendet 50%igen Alkohol mit 5% Salzsäure.

Ueber Alkohol mit anderen Säuren (Pikrin-, Essig-, Salpetersäure etc.) oder mit Jod s. bei diesen Mitteln.

104. Pyridin. Nach Souza (C. R. Soc. Biol. Paris (8) Tome 4 1887 p. 622; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 65) härtet, entwässert und hellt es zu gleicher Zeit auf. Nachher färbt man mit Theerfarbstoffen, die in Pyridin gelöst sind, oder man bringt die Gewebe erst in Wasser und färbt sie dann in gewohnter Art. Es härte rasch und sei besonders gut für Gehirne, löse aber das Myelin (überhaupt Fett) auf.

Andriezen (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 10. Bd. 1893 p. 533) verwendet als Intermedium nach Alkohol von 95% ein Gemisch gleicher Theile von Pyridin und Xylol für fertige Celloidinschnitte oder uneingebettete Schnitte durch Gehirne.

Allerdings ist, wie ich (Mayer) finde, Pyridin durchaus mischbar mit Xylol, zieht aber z. B. aus gefärbten Schnitten das Safranin und (trotz neutraler Reaktion) das Säurefuchsin aus, wäre also schon deswegen nicht allgemein verwendbar. Hauptsächlich spricht aber gegen seinen Gebrauch der auf die Dauer unerträgliche Geruch.

105. Ueber **Chloroform** als Bestandtheil von Fixirgemischen s. § 82, über **Aceton** zum Fixiren § 160 (Fish).

106. Formaldehyd. Formaldehyd oder Methylaldehyd ist der Name des Gases CH_2O, das durch Reduktion aus Ameisensäure oder durch Oxydation aus Methylalkohol entsteht und im Grossen auf letztere Art hergestellt wird. Eine 40 %ige Lösung davon in Wasser haben Schering & Co. als Formalin und Meister, Lucius & Brüning als Formol in den Handel gebracht, während eine amerikanische Firma sie Formalose nennt. Wie LEE (Anat. Anzeiger 11. Bd. 1895 p. 255) mit Recht hervorhebt, wird die schon ansehnliche Literatur über die Anwendung des Formaldehydes durch den ungenauen Gebrauch jener Ausdrücke recht konfus gemacht: manche Autoren brauchen sie durcheinander, und oft kann man gar nicht herauslesen, ob ein Autor Prozente von Formaldehyd oder von der 40 %igen Lösung meint. Am besten bezieht man ohne Zweifel die Stärke der Lösungen entweder auf Formaldehyd oder man sagt: Formol, verdünnt mit so und so viel Wasser. Verfährt man so, dann ist 4 %iges Formol ein Gemisch von 1 Th. käuflichem Formol und 24 Theilen Wasser, 4 %iger Formaldehyd hingegen (= 10 %igem Formol von 40 %) ein Gemisch von 1 Theil käuflichem Formol und 9 Theilen Wasser.

Die käuflichen Lösungen von Formaldehyd sollen sich zuweilen theilweise oder ganz unter Bildung eines weissen Niederschlages von Paraformaldehyd ($C_3H_6O_3$) zersetzen; dies tritt jedoch, wie es scheint, nur dann ein, wenn sie nicht sauer reagiren (s. NEUVILLE in: Bull. Soc. Philomath. Paris (9) Tome 1 1899 p. 108) und lässt sich durch Zusatz von Glycerin verhüten. In der Regel sind aber die käuflichen Produkte sauer, oft sogar ziemlich stark; die Säure ist wohl immer Ameisensäure.

Der Dampf von Formaldehyd reizt die Conjunctiva und die Schleimhäute sehr, aber nur vorübergehend, nicht so schlimm wie Osmiumsäure. Man benetze auch die Finger nicht mit den Lösungen, denn Formaldehyd härtet die Haut sehr rasch.

Nach KENYON (Science (2) Vol. 6 1897 p. 737) ist gegen die Dämpfe von Formaldehyd am besten Ammoniak zu verwenden, das man entweder in offenen Schalen verdunsten lässt oder dem Wasser zusetzt, mit dem man jenen aus den Objekten auswäscht.

In die histologische Technik wurde der Formaldehyd zugleich von BLUM (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 314) und HERMANN (Anat. Anzeiger 9. Bd. 1893 p. 112) eingeführt. Blum nahm Formol mit dem 10fachen Volumen Wasser verdünnt (also beinahe 4 % Formaldehyd) und sah dieses Gemisch so voluminöse Organe, wie Leber, Niere, Hirn, rascher härten als Alkohol, fand auch, dass die Schnitte sich gut färbten und die Elemente gut erhalten waren. (S. auch BLUM in: Anat. Anzeiger 9. Bd. 1894 p. 229). — Hermann nahm eine Lösung von 1/2—1 % „Formalin“ (aus dem Zusammenhang geht aber hervor, dass er Formaldehyd meint); auch er bemerkte die rasche Härtung, zugleich aber, dass

die gehärteten Organe ungefähr ihre Durchsichtigkeit und Färbung wie im Leben beibehielten. Später sind diese Beobachtungen vielfach bestätigt worden, und so steht es jetzt fest, dass für Museen das Formol ein sehr brauchbares Mittel zum Präpariren und Konserviren bildet, und, weil es den Schleim nicht undurchsichtig macht, dem Alkohol für einige Zwecke sogar weit überlegen ist (Näheres bei Blum in: Verh. Anat. Ges. 8. Vers. 1895 p. 236 und in: Ber. Seuckenberg. Ges. Frankfurt f. 1896 p. 285; ferner bei Weltner in: Sitzungsb. Ges. Nat. Freunde Berlin f. 1898 p. 57). Immerhin ist selbst für Museen das Formol wohl kaum ein Mittel zu dauernder Aufbewahrung der Objekte, wie es doch der Alkohol darstellt. Dagegen hat es vor diesem, da es ja in wässeriger Lösung verwandt wird, die Billigkeit und relativ geringe Flüchtigkeit voraus.

Sjöbring (Anat. Anzeiger 17. Bd. 1900 p. 274) hält zu histologischen Untersuchungen das Formol für besser als das Formalin. Die Wirkung des Formaldehyds auf die Gewebe bestehe in einer Oxydation der letzteren, wobei er selber in Methylalkohol umgewandelt werde. — Nach Blum (Anat. Anzeiger 11. Bd. 1896 p. 720) hingegen resultiren bei der Einwirkung von Formaldehyd auf Eiweiss höchst wahrscheinlich Methylenverbindungen, die in Wasser unlöslich sind.

Formaldehyd für makroskopische Präparate. Kaiserling (Arch. Path. Anat. 147. Bd. 1897 p. 396) fixirt die Organe von höheren Thieren in einem Gemisch von 40 ccm Formol, 200 ccm Wasser, 3 g Kaliumnitrat und 6 g Kaliumacetat 1/2 bis mehrere Tage lang, bringt sie dann zur Wiederherstellung der Farbe des Blutes auf kurze Zeit in Alkohol von 80 % und hebt sie in einem Gemisch von 20 g Glycerin, 10 g Kaliumacetat und 200 ccm Wasser auf. Sehr grosse Organe injizirt er mit einem Gemisch von 5 g Kaliumacetat, 3 g Kaliumnitrat, 40 ccm Formol uud 100 ccm Wasser. Die Präparate dienen zwar wesentlich makroskopischen Demonstrationen, sollen aber auch sonst einigermaassen brauchbar sein. — Aehnlich verfährt Melnikoff-Rasvedenkoff (C. R. Acad. Sc. Paris Tome 124 1897 p. 238), verwendet aber zuerst 10 %iges Formol mit Schwefelwasserstoff (oder mit Wasserstoffhyperoxyd, essigsauren Salzen, Hydrochinon etc.), dann Alkohol, zuletzt Glycerin mit Kaliumacetat.

Ueber den Gebrauch des Formaldehyds zum Fixiren s. § 107, zum Härten s. § 108, zum Hartmachen der Gelatine § 156, des Celloidins § 163 (Blum), zum Reduziren bei der Vergoldung § 375 (Lee).

S. ferner Plenge (Arch. Path. Anat. 144. Bd. 1896 p. 409); Gerota (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 13. Bd. 1896 p. 108; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 311), Fish (Trans. Amer. Micr. Soc. Vol. 17 1896 p. 319) und Stroud (Amer. Natural. Vol. 31 1897 p. 92). Ueber die Wirkung des Formols auf Proteïnstoffe: Gelatine, Eiweiss etc. s. Benedicenti (Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. 1897 p. 219).

107. Formaldehyd als Fixirmittel. In Folge der Konfusion in der Terminologie ist es nicht möglich, die Stärke der Lösungen genau an-

zugeben, die man bisher zum Fixiren gebraucht hat. Sie scheinen aber zwischen den von Blum und Hermann gezogenen Grenzen zu liegen, also zwischen $^1/_2$ und 4 % Formaldehyd (= $^5/_4$ und 10 % Formol). Nur Hoyer (Verh. Anat. Ges. 8. Vers. 1894 p. 237) hat das konzentrirte Formol (also 40 %igen Formaldehyd) verwandt und gibt an, dass sich darin die Gewebe besser halten als in schwachen Lösungen, ja sogar besser als in Sublimat. Indessen waltet hier sicher ein Irrthum ob: ich (Lee) finde, dass in Präparaten mit 13 $^1/_3$ % Formaldehyd (1 Vol. Formol und 2 Vol. Wasser) die Zellen enorm überfixirt sind und so homogen aussehen wie osmirte Zellen (§ 39). Versuche mit Lösungen von 2—4 % Formaldehyd haben mir ferner gezeigt, dass gleich jener starken Lösung auch diese dem Zellplasma ein homogenes, glasiges Aussehen verleihen, zugleich aber die Gewebe beträchtlich zum Quellen bringen. Bei 2 % ist die Vacuolisirung sehr stark. So bin ich zu dem Schlusse gekommen, dass der Formaldehyd allein durchaus ungeeignet für cytologische Untersuchungen ist.

Indessen hat man, was ich (Mayer) besonders hervorheben möchte, bisher so gut wie gar keine Rücksicht auf die Wirkung der Säure im käuflichen Formol und auf die Isotonie der Lösungen mit dem Safte der Gewebe genommen. Nur Mann (Verh. Anat. Ges. 12. Vers. 1898 p. 39) braucht ausdrücklich neutrales Formol; er gewinnt es, indem er das gewöhnliche über Magnesium- oder Natriumkarbonat stehen lässt. Ferner hat Herbst (Arch. Entwickelungsmech. 9. Bd. 1899 p. 292) für marine Crustaceen Formol in Seewasser (die Stärke der Lösung sei unwichtig) mit Erfolg benutzt. Meine eigenen Versuche an allerlei Seethieren ergeben, dass der Unterschied zwischen gleich starken Verdünnungen mit See-, Süss- und destillirtem Wasser ganz enorm ist, sodass ich für Seethiere ausschliesslich ein Gemisch von 1 Th. Formol und 9 Th. Seewasser (also 4 %igen Formaldehyd) benutze. Hierin aber werden, so weit ich sehen kann, die Gewebe durchaus befriedigend fixirt.

Nach Fischer (Fixirung etc. p. 24) ist 4 %iger Formaldehyd zum Fixiren zu schwach; eher eignet sich wohl 10 %iger, aber selbst der konzentrirte hat nur „mittlere Fällungskraft".

Auch Sjöbring (Anat. Anzeiger 17. Bd. 1900 p. 274) verwendet den Formaldehyd isotonisch; speziell für Säugethiere nimmt er ihn 8 %ig, d. h. 1 Theil Formol und 4 Theile Wasser; dieses Gemisch sei nämlich erfahrungsgemäss isotonisch. Die Stärke des Alkohols, in den die Objekte unmittelbar aus dem Fixirgemisch gebracht werden, sei für Säugethiere 95 %, für niedere Thiere

noch genauer zu bestimmen (für *Anodonta* 50%). Die Färbbarkeit der Gewebe sei aber viel geringer als nach Fixirung mit Sublimat oder reinem Alkohol. — Ich (MAYER) habe dies im Allgemeinen bei meinen Versuchen nicht gefunden, indessen weder dieselben Objekte wie Sjöbring noch auch eine so starke Lösung benutzt. Sehr viel wird auch von der Nachbehandlung mit Alkohol abhangen, die ja bei Seethieren anders sein muss als bei Landthieren.

HOYER (Verh. Anat. Ges. 9. Vers. 1894 p. 236) bringt die Objekte (1 ccm grosse Stücke) aus dem konzentr. Formol auf 12—24 Stunden in Alkohol und bettet sie in Paraffin ein. — ALLEGER (Proc. Amer. Micr. Soc. Vol. 15 1894 p. 192) bringt sie aus dem 2—10%igen (oder auch stärkeren) Formol in Alkohol von 50—70% und bettet sie ebenfalls in Paraffin ein.

SCHULTZE (Arch. Mikr. Anat. 55. Bd. 1899 p. 174) fixirt die Eier von *Rana* mit einer heissen Lösung von Formaldehyd (2% Formol von 75—80° C. 5 Minuten lang, dann Alkohol von 70%).

Dämpfe von Formaldehyd zur Fixirung des Blutes wendet DEETJEN (*Münch. Med. Wochenschrift 1897 No. 43; Centralbl. Bakt. 1. Abth. 23. Bd. 1898 p. 615) an.

Ueber die Fixirung der Sekretgranula in den Zellen durch 10%iges Formol s. unten § 641 Benda. — S. ferner im § 109 die Gemische von Formaldehyd mit Kaliumbichromat, Pikrinsäure, Sublimat etc.

108. Formaldehyd als Härtmittel. Während über die Brauchbarkeit des Formaldehyds zum Fixiren die Ansichten der Forscher noch weit auseinander gehen, ist man sich von Anfang an über seine Verwendbarkeit zum Härten der Gewebe nicht im Zweifel gewesen.

So fand bereits HERMANN (Anat. Anzeiger 9. Bd. 1893 p. 112) ein so grosses Organ wie ein Kalbherz in einer ½—1%igen Lösung in 12—24 Stunden hart; ganze Augen wurden in der 1%igen Lösung nach 24 Stunden so hart, dass man sie mit dem Messer wie einen Apfel halbiren konnte. Allerdings ergab sich dabei der Nachtheil, dass die so gehärteten Gewebe, wenn sie zum Entwässern in Alkohol kamen, litten.

Ueber Grad und Art der Härtung mit Formaldehyd drücken sich hingegen die Autoren nicht bestimmt aus. Nach unsern eigenen Versuchen werden die Gewebe elastisch, nicht brüchig. Wahrscheinlich schwankt dies aber beträchtlich nach den Geweben.

Für lange Härtung muss man viel Flüssigkeit nehmen und sie von Zeit zu Zeit wechseln. Denn das Formaldehyd verbindet sich mit den Geweben, und so wird die Lösung allmählich immer schwächer.

Ferner ist die Isotonie mit den Gewebesäften zu beachten (s. oben § 107); sie wird übrigens auch von HORNELL (Labor. et Museum Berlin No. 5 1900 p. 86) für wasserreiche Seethiere (Salpen, Medusen etc.) als unerlässlich bezeichnet.

Hornell, der die Seethiere nur für Museen oder zu Secirübungen konservirt, macht ferner darauf aufmerksam, dass die Säure im Formol den Kalk ausziehe. Er verwendet theils Formol allein (5—8%), theils in Gemischen mit Alkohol.

Eine Art von Schnellhärtung empfiehlt Blum (Anat. Anzeiger 11. Bd. 1896 p. 724). Er legt kleine Objekte auf 6—8 Stunden in „Formollösung 1 : 10" (d. h. 1 Th. käufliches Formol + 10 Th. Wasser), dann auf ebenso lange Zeit in absoluten Alkohol, nachher auf 1—2 Stunden in Alkohol mit Aether, endlich auf einige Stunden in eine Celloidinlösung; nun werden sie auf Stücke Kork aufgeklebt und, eben fest, in ein Gemisch von schwachem Spiritus und Formol (Genaueres wird nicht angegeben) gebracht, wo das Celloidin erhärtet. So kann man schon in 24 Stunden ein frisches Objekt schneidfähig machen. Von der Verwendung des Formols zum rascheren Gefrieren nach Plenge (Arch. Path. Anat. 144. Bd. 1896 p. 409) räth Blum als überflüssig und komplizirt ab.

Ueber die Härtung des Nervengewebes mit Formaldehyd s. § 678, 681 und 744.

109. Gemische von Formaldehyd mit anderen Mitteln. Die meisten Gemische dieser Art sind insofern irrationell, als sie sich leicht zersetzen. Denn das Formaldehyd als reduzirendes Agens verträgt sich nur schlecht mit Chromsäure, Sublimat etc., und die Ameisensäure im käuflichen Formol wirkt nach derselben Richtung hin. Gerühmt werden die Gemische von ihren Autoren in der Regel sehr, ohne dass aber bei der oft grossen Komplikation klar würde, welchen Bestandtheilen denn eigentlich die gute Wirkung zu verdanken sei.

Die in der vorigen Auflage p. 53 von mir (Lee) empfohlenen Gemische mit Chromsäure oder Platinchlorid werden hier nicht wieder aufgeführt, da es mir jetzt scheint, als ob ich die guten Resultate damals nicht durch das Formol, sondern trotz ihm erhalten habe.

a) Formaldehyd mit Kaliumbichromat oder Chromsäure. Möller (Zeit. Wiss. Z. 66. Bd. 1899 p. 85) fixirt den Darm von Säugethieren 1 Tag lang in einem Gemisch von 1 Vol. Formol und 4 Vol. 3%iger Lösung von Kaliumbichromat, härtet ihn in letzterer Lösung 3--4 Tage nach, wässert ihn einige Stunden lang aus und bringt ihn in Alkohol von 70%.

Andere Gemische dieser Art zur Fixirung des Nervengewebes (für die Reaktion nach Golgi) s. unten § 744, des Knorpels § 791, der Nebennieren § 814.

Orth (*Berliner Klin. Wochenschr. 1896 No. 13; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 316) empfiehlt zum Härten ein Gemisch von 1 Theil Formol und 10 Theilen Müllerschem Gemisch. Nach mehreren Tagen verdirbt dies aber und muss daher stets frisch bereitet werden. (Dieses und ähnliche Gemische gehen leider unter dem scheusslichen Namen Formol-Müller.)

Lo Bianco verwendet (nach mündlicher Mittheilung) jetzt an Stelle seiner Chromosmiumsäure zum Fixiren von Seethieren ein Gemisch von 10 Theilen 1%iger Chromsäure, 1 Th. Formol und 9 Th. Seewasser. Es darf aber

nur $^1/_2$—1 Stunde wirken, und dann werden die Thiere gradatim in starken Alkohol gebracht.

b) Formaldehyd mit Pikrinsäure. GRAF (New York State Hosp. Bull. Vol. 2 1897 p. 35) empfiehlt besonders für Hirudineen das Pikro-Formalin, d. h. Gemische von Formol und Pikrinsäure (nachher Auswaschen mit Alkohol von 30%). S. auch § 97 u. 98 und unten e).

c) Formaldehyd mit Alkohol. Wohl zuerst von PARKER & FLOYD für Gehirne mit der Absicht empfohlen, dass die Schrumpfung durch den Alkohol und die Quellung durch das Formol sich im Gemische (Genaueres s. unten § 681) die Wage halten sollten.

GULLAND (Zeit. Wiss. Mikr. 17. Bd. 1900 p. 222) verwendet für Blut ein Gemisch von 1 Theil Formol und 9 Theilen Alkohol (wie stark dieser?), LAVDOWSKY (Anat. Hefte 1. Abth. 4. Bd. 1894 p. 361) zum Studium der Mitose folgende Gemische:

1. Wasser 40, 95%iger Alkohol 20, Formol 6, Eisessig 1 Theil;
2. Wasser 30, „ 15, „ 5, „ 1 Theil.

HORNELL (Labor. et Museum Berlin 1900 No. 5 p. 86) braucht „Formalin-Alkohol", d. h. ein Gemisch von 1 Th. Formol, 9 Th. Wasser und 10 Th. Alkohol (Stärke nicht angegeben!) zur Konservirung mancher Seethiere für Museen und zu Secirübungen.

d) Formaldehyd mit Kupfersulfat. NELIS (Bull. Acad. Sc. Belg. f. 1899, 1900 p. 726) fixirt Spinalganglien 24 Stunden lang in einem Gemisch von 1 Liter 7%igen Formols und 5 ccm Eisessig, worin 20 g Kupfersulfat und dann Sublimat bis zur Sättigung aufgelöst sind. Es soll die Zellen nicht kontrahiren und alle Färbungen erlauben.

e) Formaldehyd mit Sublimat. Gemische dieser Art geben bereits kalt, noch rascher aber heiss einen weissen kristallinischen Niederschlag, den ich (MAYER) für Quecksilberchlorür (Kalomel) halte. Er entsteht aber, wie mir scheint, nicht durch das Formol an sich, sondern durch die Ameisensäure darin.

MANN (Verh. Anat. Ges. 12. Vers. 1898 p. 39) verwendet für Nervenzellen ein Gemisch von $2^1/_2$ g Sublimat, 1 g Pikrinsäure, 5 ccm Formol und 100 ccm Wasser.

BRANCA (Journ. Anat. Phys. Paris 35. Année 1899 p. 767) rühmt für Wirbelthiere eine gesättigte wässerige Lösung von Sublimat, in der Pikrinsäure bis zur Sättigung aufgelöst ist, und von der 60 ccm beim Gebrauch mit 10 ccm Formol und 1 ccm Eisessig versetzt werden.

BOUIN (Arch. Biol. Tome 17 1900 p. 211) fixirt die jungen Larven von *Rana* mit „formol sublimé" (1 Th. Formol, 3 Th. gesättigte wässerige Sublimatlösung) 2—3 Stunden lang und bringt sie nach raschem Abspülen mit Wasser direkt in Alkohol von 70%.

S. auch oben d).

f) Formaldehyd mit Platinchlorid. BOUIN (l. c.) ersetzt in Hermanns Gemisch die Osmiumsäure durch Formol. S. auch § 98 (BOUIN) und § 791 (RETTERER).

---

5. Kapitel.

Ersetzen des Alkohols durch Intermedien.

110. Allgemeines. Als Intermedien möchte ich (Mayer) die Flüssigkeiten bezeichnen, deren Funktion es ist, den Alkohol aus den Objekten zu entfernen, damit entweder das Harz, worin die fertigen Präparate gewöhnlich aufbewahrt werden, oder das Paraffin (beim Einbetten) eindringen könne. Meist sind es ätherische Oele oder Kohlenwasserstoffe, und um obigen Ansprüchen zu genügen, müssen sie sich sowohl mit dem Alkohol als auch mit den Harzen und Balsamen oder dem Paraffin klar mischen. Sie haben allermeist in Folge ihrer starken Lichtbrechung auch die Eigenschaft, die Gewebe durchsichtig zu machen, indem sie zwischen deren gleichfalls stark brechende Bestandtheile eindringen, und heissen daher gewöhnlich Aufhellmittel. Indessen ist ein solches auch jedes Harz, ferner das Glycerin, und man darf daher beide Begriffe nicht miteinander verwechseln, sondern muss sagen: nicht alle Aufhellmittel sind Intermedien, und nicht alle Intermedien hellen zugleich auf. Letzteres gilt z. B. vom Chloroform, das zwar eins der besten Intermedien ist, indessen das Licht nicht stark genug bricht, um die Präparate ganz aufzuhellen.

Man hat es früher für durchaus nöthig gehalten, die Objekte vor dem Einschluss in Balsam aus dem Alkohol erst in ein ätherisches Oel zu bringen, um sie aufzuhellen; dabei hat man ganz übersehen, dass das Aufhellen nur eine Nebenwirkung bei diesem Vorgange darstellt, und dass es allein darauf ankommt, das Objekt von dem Alkohol zu befreien, der sich nicht mit dem Balsam klar mischt. (Der venetianische Terpentin gestattet es übrigens, die Objekte direkt aus dem Alkohol ohne Aufhellen definitiv einzuschliessen, s. § 436.) Es lohnte sich wohl, auch für das Verdrängen des Alkohols durch die Intermedien eine kurze Bezeichnung zu schaffen, etwa (nach Analogie von entwässern) entspriten. Apáthy (Mikrotechnik p. 74) nennt die Intermedien Vormedien, ich (dieses Buch 1. Aufl. p. 63) Vorharze, doch scheint mir der neue Terminus besser zu sein.

111. Entfernen des Alkohols aus den Objekten. Früher nahm man einfach das Objekt aus dem Alkohol und brachte es auf dem Intermedium in einem Uhrglas zum Schwimmen. Das war falsch, denn der Alkohol entwich in die Luft meist rascher, als das Intermedium eindrang, mithin musste das Objekt schrumpfen. Um dies zu vermeiden oder ganz zu verhüten, macht man es gewöhnlich nach MAYER (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 23) oder GIESBRECHT (Z. Anzeiger 4. Jahrg. 1881 p. 483) so, dass man den Alkohol allmählich durch das Intermedium ersetzt. Und zwar so: man füllt in einen kurzen Glastubus so viel Alkohol, dass er die Objekte bedecken kann (ein Uhrglas thut es oft auch, aber ein Tubus ist besser). Mit einer Pipette lässt man nun unter den Alkohol sorgfältig die nöthige Menge des Intermediums fliessen (oder man giesst umgekehrt den Alkohol sorgfältig auf letzteres) und gibt dann die Objekte in den Alkohol. Sie sinken darin sofort bis zur unteren Grenze des Alkohols, erst nach einiger Zeit aber kommen sie auf dem Grunde des Tubus an. Man glaube jedoch nicht, sie seien vollständig vom Intermedium durchdrungen, bevor sich nicht die Schlieren, die sich durch die Mischung der beiden Flüssigkeiten bilden, vollständig verzogen haben, und erst dann darf man den oben schwimmenden Alkohol absaugen.

Unbedingt nöthig ist auch der Ersatz dieser ersten Menge des Intermediums, die ja trotz aller Vorsicht noch etwas Alkohol enthält, durch ein zweites und bei grossen Objekten sogar durch ein drittes Quantum. Ueberhaupt kann man in dieser Beziehung nicht leicht vorsichtig genug sein, besonders wenn es sich um die Einbettung in Paraffin handelt.

Nur bei der Einbettung in Celloidin, wo als Intermedium allermeist ein Gemisch von Alkohol und Aether dient, kann man viel einfacher verfahren (s. hierüber § 160).

Alle Intermedien dringen in der Wärme leichter ein.

Bei Objekten mit sehr undurchlässigen Wandungen, z. B. manchen Arthropoden (Pantopoden, *Chelifer* etc.) ereignet es sich nicht selten, dass beim Uebertragen aus dem Intermedium in Balsam oder Paraffin diese Stoffe weniger rasch hinein diffundiren, als das Intermedium heraus. Die Folge davon ist das Auftreten von Luft oder Gas in den Geweben; mitunter werden dadurch die Präparate unbrauchbar. Bei solchen in Balsam zeigt sich diese unangenehme Erscheinung zuweilen erst nach Monaten oder selbst nach Jahren; hierüber unten § 429 und MAYER (Z. Anzeiger 4. Jahrg. 1881 p. 593: Kieselnadeln von *Wagnerella)*, sowie BORGERT (Z. Jahrb. Abth. Morph. 14. Bd. 1900 p. 208).

Oft wird das Intermedium, womit die Objekte im Uhrglase oder auf dem Objektträger behandelt werden, nach kurzer Zeit trübe und wirkt dann nicht mehr gut. Es schlägt sich nämlich Wasserdampf aus der Luft darauf nieder. Diese Trübung lässt sich zwar meist durch Erwärmen entfernen (JACKSON in: Z. Anzeiger 12. Jahrg. 1889 p. 630), aber das gelingt nicht immer, denn bei sehr feuchter Atmosphäre, namentlich am Meeresstrande, bleibt sie trotz langen Erwärmens bestehen. Deswegen bediene man sich, wenn irgend möglich, stets flacher, gut verkorkter Tuben, denn alsdann kommt diese Erscheinung nur selten vor. Auch athme man ja nicht auf das Intermedium.

112. Eintheilung der Intermedien. Während in früheren Jahren fast ausschliesslich ätherische Oele als Intermedien benutzt wurden, hat man gegenwärtig die Wahl zwischen diesen, einigen Kohlenwasserstoffen und noch anderen Substanzen, z. B. Anilin und Phenol. Nach den spezielleren Zwecken aber, denen die Intermedien dienen sollen, lassen sich diese ohne Rücksicht auf ihre chemische Beschaffenheit etwa in folgender Weise eintheilen. Man verwendet:

1. beim Einbetten der Objekte in Paraffin: Benzol, Chloroform, Cedernöl. Genaueres hierüber und über die hierzu weniger brauchbaren Mittel s. in § 137.

2. beim Einbetten in Celloidin: ein Gemisch von Aether und Alkohol, auch wohl Aceton. Genaueres in § 159.

3. beim Einschliessen der Paraffinschnitte in Harze: Xylol, Benzol, Chloroform etc. Genaueres in § 149.

4. beim Einschliessen der Celloidinschnitte in Harze: Bergamottöl, Origanumöl, Thymianöl, Karbolsäure, Xylol etc. Genaueres in § 168.

5. beim Einschliessen ganzer Objekte in Harze: Nelkenöl, Cedernöl, auch wohl Methylsalicylat oder Linaloëöl.

6. beim Zerlegen ganzer Objekte und zum temporären Einschliessen darin, z. B. um sie darin unter dem Deckglase umherrollen und so von allen Seiten beobachten zu können: Nelkenöl, Cedernöl, Rizinusöl, Methylsalicylat, auch wohl Xylol. S. hierüber auch § 9 und 437 ff.

Nach UNNA (Monatsh. Prakt. Dermat. Ergänzungsh. 1885 p. 58) sind den Färbungen mit Fuchsin am schädlichsten unter den gebräuchlichen Intermedien Nelkenöl und Terpentinöl; besser verhält sich Cedernöl, noch besser Gaultheriaöl und am besten Benzol und Xylol.

113. Optische Eigenschaften der Intermedien. Wie schon oben § 110 erwähnt, ist beim Gebrauch der Intermedien ihre Eigenschaft, die Objekte aufzuhellen, allermeist recht nebensächlich. Nur in den Fällen sub § 112 No. 6 ist

sie wichtig, und nur mit Rücksicht hierauf lohnt es sich noch, eine Liste der Brechungsindices zu bringen, so gut sie sich hat zusammenstellen lassen. Man ersieht aus ihr z. B., dass Cedernöl dem Crownglas nahe kommt — allerdings gilt dies nur von dem an der Luft eingedickten, nicht von dem frischen dünnen, das etwas schwächer bricht — daher beinahe so stark wie Kanadabalsam aufhellt. Zimmtöl hat einen höheren Index, hellt mithin stärker auf als Balsam. Terpentinöl und Bergamottöl haben dagegen viel niedere Indices, und dies gilt erst recht vom Chloroform. Ohne Zweifel bezieht sich beim Kanadabalsam die Zahl 1.535 auf das feste Harz, nicht auf seine Lösung in Chloroform oder Xylol, wo sie erheblich kleiner sein wird.

Zum grössten Theile sind die Indices nach Behrens, Tabellen z. Gebrauch bei mikr. Arbeiten (3. Aufl. Braunschweig 1898 p. 146 ff.) aufgeführt; es sind auch einige sonst interessirende Stoffe darin aufgenommen. — Die Liste von M'Clung (Kansas Univ. Quart. Lawrence Vol. 7 A 1898 p. 197) weicht stark davon ab.

Luft	1.000	Gummi arabicum	1.514
Methylalkohol	1.330	Crownglas	1.518
dest. Wasser	1.336	Cedernöl, eingedickt	1.520
Seewasser	1.343	Dammarharz	1.520
Eiweisslösung	1.350	Citronenöl	1.527
absol. Alkohol	1.367	Nelkenöl	1.533
Kaliumacetat, konz. Lösung in Wasser	1.370	Kanadabalsam	1.535
		Kreosot	1.538
Glycerin 1 Th. u. Wasser 1 Th.	1.397	Kolophonium	1.545
Chlorcalciumlösung (90 %)	1.411	Karbolsäure (Phenol)	1.550
Chloroform	1.449	Anisöl	1.557
Bergamottöl	1.464	Zimmtöl	1.567
Paraffinum liquidum	1.471	Anilin	1.588
Olivenöl	1.473	Schwefelkohlenstoff	1.628
Terpentinöl	1.473	Tolubalsam	1.640
Glycerin (spez. Gew. = 1,262)	1.473	Schwefel in Schwefelkohlenstoff	1.644
Rizinusöl	1.481	Monobromnaphthalin	1.661
Toluol	1.496	Methylenjodid	1.743
Xylol	1.497	Phosphor	2.184
Benzol	1.501	Diamant	2.470
Cedernöl	1.510		

114. Aetherische Oele. Von ihnen sind am frühesten als Intermedien hauptsächlich gebraucht worden Terpentinöl und Nelkenöl, ersteres wird aber mit Recht gegenwärtig kaum noch angewandt.

Bereits Stieda (Arch. Mikr. Anat. 2. Bd. 1866 p. 431) prüfte 26 Oele auf ihre Brauchbarkeit, und später haben Neelsen & Schiefferdecker (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1882 p. 204) sowie Jordan (Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1898 p. 50) ebenfalls so ziemlich dieselben Oele (aus der bekannten Fabrik von Schimmel & Co. in Leipzig) untersucht, allerdings vorwiegend auf ihre Verwendbarkeit für

Celloidinschnitte. Empfohlen werden von N. & Sch. nur das Cedernöl, Origanumöl und Sandelöl; aus der Publikation von Jordan geht als brauchbar und sonst noch nirgend erwähnt das Linaloëöl hervor.

Bei den Prüfungen der jüngeren Autoren wurde ausser dem Verhalten der Oele gegen Celloidinschnitte auf den Geruch, der nicht gar zu unangenehm, und auf den Preis,*) der nicht gar zu hoch sein sollte, geachtet. Es versteht sich aber von selbst, dass die beiden letzteren Kriterien als zu variabel bei der Empfehlung nicht den Ausschlag geben können. In der That scheint mir (Mayer) denn auch bei Sch. & N. das Bergamottöl unverdient ziemlich in den Hintergrund getreten, das Origanumöl zu sehr bevorzugt worden zu sein.

M'Clung gibt in der Liste der Indices (oben § 112) der „clearing and mounting media" auch das Verhalten vieler Oele gegen Alkohol an. Leider geht aus den amerikanischen Namen für manche Oele nicht hervor, welche gemeint sind.

115. Bergamottöl. Bereits von Stieda (Arch. Mikr. Anat. 2. Bd. 1866 p. 434) als brauchbar erwähnt. In guter Qualität ist es für Celloidinschnitte sehr verwendbar, aber es ist offenbar im Handel nicht stets gleichmässig vertreten. Gutes Oel muss nach Apáthy (Mitth. Z. Stat. Neapel 7. Bd. 1887 p. 745) grasgrün (höchstens mit gelblichem Ton) sein, darf Celloidin nicht erweichen und muss sich mit 90 %igem Alkohol ganz klar mischen; leistet es das nicht, so soll man ihm 5—10 % absoluten Alkohol zusetzen (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 168). — Nach Schimmel & Co. (Bericht vom Oktober 1896) muss es sich in Alkohol von 80 % klar lösen. — Nach Suchannek (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 158) nimmt gebleichtes, farbloses nicht viel Wasser auf, grünes hingegen bis zu 10 Prozent.

Es bricht das Licht schwächer als Terpentinöl, steht also in der Refraktion unter den gebräuchlichen Oelen am tiefsten.

Neelsen & Schiefferdecker (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1882 p. 206) ziehen es für Celloidin dem Nelkenöl vor, stellen es aber hinter das Origanumöl und Cedernöl.

116. Cedernöl (Cedernholzöl). Dünnflüssig, hellgelb oder grünlich, riecht schwach nach Cedernholz, verdunstet langsam, ändert sich nicht

*) Die Preise schwanken ungemein. So erwähnen Schimmel & Co. in ihrem Bericht vom Oktober 1896, dass 100 Kilo Nelkenöl im Grosshandel 1875 M. 380, dagegen 1896 nur M. 38 kosteten. In ihrer Preisliste vom Herbst 1900 geben sie als Preise für das Kilo an: Bergamottöl 19 und 21, Cedernöl 3 und 12 (eingedickt), Nelkenöl 6, Origanumöl 12 (gall.) und 20 (cret.) Mark. Das Cedernöl sei nur deshalb so billig, weil es aus Abfällen von der Fabrikation der Bleistifte destillirt werde (Bericht vom Oktober 1897).

am Licht, mischt sich mit Chloroformbalsam (s. auch § 625 Eisig). Verdrängt bereits 95 %igen Alkohol aus den Objekten ohne Schrumpfung, zieht Theerfarben nicht aus. Celloidinschnitte werden aber erst in 5—6 Stunden frei von Alkohol.

Man achte genau auf die Qualität des Oeles. Ich (Lee) habe eine Probe von der bekannten Firma Rousseau in Paris geprüft: sie war ganz farblos, entfernte aber sogar absoluten Alkohol aus den Objekten selbst nach vielen Tagen nicht. Nach meinen Erfahrungen ist es das allerbeste Intermedium beim Einbetten in Paraffin; es schadet den Zellen und zarten Geweben weniger als irgend ein anderes Mittel. (S. auch § 137.)

Das Cedernöl, besonders das dünnflüssige, scheidet mit der Zeit feinste Wassertröpfchen aus. Man braucht es aber dann nur zu filtriren, um es wieder ganz klar zu erhalten.

Jordan (Zeit. Wiss. Mikr. 17. Bd. 1900 p. 193) verwendet Cedernöl zur Verbesserung der Konsistenz der Celloidinblöcke. S. unten § 170.

117. Nelkenöl. Es ist von Rindfleisch (Arch. Mikr. Anat. 1. Bd. 1865 p. 138) in die Mikrotechnik eingeführt worden. Frisch destillirtes Oel ist hell, wird aber schon bald dunkel. Wenn man nun auch im Allgemeinen besser helles verwendet, so muss man doch gut zusehen, ob dieses nicht verfälscht ist, was leicht vorkommt.

Der hohe Brechungsindex (1.533) macht es sehr verwendbar als temporäres Einschlussmittel. Auch verbreitet es sich nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 25) nicht leicht über den Objektträger hin, sondern bildet gern sehr hohe Tropfen, eignet sich deswegen ungemein zur Vornahme feiner Präparationen mit Nadeln; auch dass es die Objekte nach einiger Zeit sehr brüchig macht, ist bei solchen Präparaten oft sehr nützlich. Man kann übrigens Beidem durch Zusatz von Bergamottöl entgegenwirken.

Nach Behrens (Tabellen 3. Aufl. 1898 p. 33) verträgt es von den gebräuchlichsten Oelen am meisten Wasser, da es sich bereits mit Alkohol von 74 % klar mischt. Gerade wegen dieser Eigenschaft ist es von jeher beim Einschliessen in Balsam benutzt worden. Man thut aber nach meinen (Mayer) Erfahrungen gut daran, es bei dickeren Präparaten nachher durch Xylol zu ersetzen, sowohl um sicher zu gehen, dass das Objekt nun wirklich kein Wasser mehr enthält, als auch weil das Oel sonst nach einiger Zeit in den Objekten stark nachdunkeln kann.

Das Nelkenöl löst Celloidin und darf daher ohne besondere Vorsicht nicht für Celloidinschnitte angewandt werden. Frisches Oel zieht Theerfarben aus den Objekten leichter aus als altes. Man hält also am besten echtes Oel von beiden Sorten vorräthig.

Das Eugenol, der Hauptbestandtheil des Nelkenöls, scheint als Intermedium bisher nicht angewandt worden zu sein.

118. Origanumöl (STIEDA in: Arch. Mikr. Anat. 2. Bd. 1866 p. 433; NEELSEN & SCHIEFFERDECKER in: Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1882 p. 205). Dünn, hell braun, verdunstet nicht sehr rasch, verändert sich nicht am Licht, mischt sich mit Chloroformbalsam, verdrängt schon 95 %igen Alkohol rasch aus Objekten und Celloidinschnitten, zieht aber die Theerfarben etwas aus, ist also in erster Linie für Celloidinschnitte geeignet.

Obiges gilt nach VAN GIESON (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 482) nur für Ol. Origani cretici (Spanischhopfenöl), nicht auch für Ol. Origani gallici. Die Sorten wirken sehr verschieden auf Celloidinschnitte, daher sorge man für ein gutes Oel.

Nach SQUIRE (Methods p. 81) ist das Ol. Origani des Handels nur verfälschtes Oel von weissem Thymus, und was man als Ol. Origani cretici verkauft, wahrscheinlich Majoranöl. Ob das für England gilt, mag dahin gestellt bleiben, in Deutschland aber lässt sich beiderlei Oel unverfälscht haben. Der Geruch ist auch so verschieden, dass ich (MAYER) gar nicht recht begreife, wie Majoran-, Thymian- und Origanumöl mit einander verwechselt werden können. SCHIMMEL & Co. geben allerdings vom Thymianöl an, dass das weisse in Frankreich mit Terpentinöl (bis zu 50 %) verfälscht werde (Bericht vom Oktober 1895 p. 69).

119. Cajeputöl. Wird bereits von STIEDA (Arch. Mikr. Anat. 2. Bd. 1866 p. 434) erwähnt, aber erst von NISSL (Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 82) ernstlich als Intermedium für Balsam benutzt. Das grüne nimmt vielleicht mehr Wasser auf, als das farblose. Leider ist der Geruch auf die Dauer nicht angenehm. — S. auch JORDAN in: Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd. 1899 p. 46.

120. Linaloëöl. Von JORDAN (Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1898 p. 51) als brauchbar für Celloidinschnitte empfohlen. Nach meinen (MAYER) Erfahrungen steht es aber hierbei gutem Bergamottöl nach. Als Intermedium für Balsam scheint es mir deswegen brauchbar, weil es ganz farblos bleibt; nur ist es empfindlicher gegen nicht wasserfreien Alkohol als z. B. Nelkenöl.

121. Sandelöl (NEELSEN & SCHIEFFERDECKER, citirt oben § 118). Brauchbar für Celloidinschnitte, aber unnöthig theuer.

122. Terpentinöl. Bereits vor 1860 von CLARKE (Phil. Trans. Vol. 149 1860 p. 459) als Intermedium für uneingebettete Schnitte durch Rückenmark angewandt, wurde es später viel zum Entfernen des Paraffins aus den Schnitten

benutzt, da es dieses leicht löst, aber Xylol etc. sind hierfür besser. Es wird auch hie und da (s. z. B. RAWITZ, Leitfaden 2. Aufl. p. 33) gebraucht, um aus den Objekten den Alkohol zu verdrängen, führt aber beträchtliche Schrumpfungen herbei und ändert die Zellstruktur ungemein. In summa, man sieht am besten von seiner Verwendung ganz ab.

123. Thymianöl. Nach dem Vorgange von BUMPUS (Amer. Natural. Vol. 26 1892 p. 80) meint FISH (Proc. Amer. Micr. Soc. Vol. 15 1893 p. 86; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 503), in den meisten Fällen lasse sich das Origanumöl gut, wenn nicht besser, durch Thymianöl ersetzen. Das rothe sei als Intermedium genau so gut wie das rectifizirte farblose. — S. auch § 118.

Nach BEHRENS (Tabellen 3. Aufl. 1898 p. 83) würde Thymianöl noch empfindlicher gegen Wasser sein als Terpentinöl. Dies dürfte wohl nicht zutreffen.

124. Zimmtöl (Cassiaöl). Aehnelt im optischen Verhalten dem Nelkenöl sehr, ist aber meist dünner. Da es gegen Wasser relativ empfindlich ist, so kann es als Intermedium beim Einbetten in Paraffin und für Celloidinschnitte mit Vortheil gebraucht werden. Bereits STIEDA (Arch. Mikr. Anat. 2. Bd. 1866 p. 434) empfiehlt es.

125. Anethol. Anisöl. Anethol wird von STEPANOW (Zeit. Wiss. Mikr. 17. Bd. 1900 p. 185) zum Durchtränken von Celloidinblöcken benutzt, die alsdann auf dem Gefriermikrotom geschnitten werden können, da Anethol bereits bei etwa 20° C. erstarrt.

Zu ähnlichem Zwecke hat KÜHNE (Centralbl. Bakt. 12. Bd. 1892 p. 28) das Anisöl empfohlen, das schon bei 15° C. zum Theil erstarrt ist, also leicht gefriert. Die Objekte werden aber ohne jegliche Einbettung mit dem Oel durchtränkt und auf das Mikrotom gebracht.

126. Gaultheriaöl. Methylsalicylat. Das natürliche Oel ist bereits von STIEDA (Arch. Mikr. Anat. 2. Bd. 1866 p. 434) als gut empfohlen und dann von UNNA (Monatsh. Prakt. Dermat. Ergänzungsh. 1885 p. 53) zum Verdünnen des Kanadabalsams benutzt worden; das künstliche (Methylsalicylat) wird neuerdings von GUÉGUEN (C. R. Soc. Biol. Paris (10) Tome 5 1898 p. 285) als Intermedium vor Balsam und beim Einbetten in Paraffin sehr gerühmt. Brechungsindex 1.53, also fast wie Kanadabalsam.

Nach meinen (MAYER) Erfahrungen ist das Methylsalicylat recht brauchbar, da es farblos bleibt, ganz ohne Rückstand verdunstet und auch die meisten Farben nicht angreift; allerdings löst es etwas Methylgrün auf. Leider ist es sehr empfindlich gegen Wasser. Ich habe seit 21 Monaten ein mit Hämalaun gefärbtes Präparat darin liegen (umrahmt mit Apáthys Zuckersyrup) und finde es noch ganz unverändert.

127. Karbolsäure (Phenol). Wird am besten in konzentrirter Lösung in Alkohol angewandt und durchdringt sogar sehr wasserhaltige Objekte rasch. Es ist ein gutes Mittel; man vermeidet es aber besser bei weichen Objekten, die man in Balsam einschliessen

will, da sie in diesem gewöhnlich schrumpfen. Dagegen ist es für Celloidinschnitte gut, wird indessen hier gewöhnlich im Gemisch mit Xylol angewandt. Genaueres s. in § 168.

Besonders in England wird die Karbolsäure noch viel von Liebhabern der Mikroskopie zum Entwässern ganzer Insekten benutzt, die auf diese Weise allerdings sehr rasch in Balsam gebracht werden können.

128. Kreosot. Es ist zuerst 1863 von Kutschin angewandt und dann von Stieda (Arch. Mikr. Anat. 2. Bd. 1866 p. 431) warm empfohlen worden. Es hat fast die nämlichen Eigenschaften wie Karbolsäure (§ 127). Man nehme aber Kreosot aus Buchenholztheer; es eignet sich sehr für Celloidinschnitte.

129. Anilin (Anilinöl). Es ist, wie es scheint, zuerst von Weigert (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 491), und zwar im Gemisch mit Xylol für Celloidinschnitte gebraucht worden und ist ein ziemlich wichtiges Intermedium, da es viel Wasser aufnehmen kann: das gewöhnliche ist schon für Schnitte aus 70%igem Alkohol verwendbar, einerlei, ob es farblos oder durch Oxydation braun geworden ist. In schwierigen Fällen muss man aber zu ganz wasserfreiem Anilin greifen (seine Herstellung s. bei Suchannek in: Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 156). Man verwendet Anilin hauptsächlich für Celloidinschnitte, oft mit sehr gutem Erfolge, s. § 168. S. ferner die eigenthümliche Methode von Ciagliński (Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 28: Entwässerung der Objekte durch Anilin; dann durch Xylol in Paraffin).

Ueber **Pyridin** s. oben § 104.

130. Chloroform. Von Giesbrecht (Z. Anzeiger 4. Jahrg. 1881 p. 83) als Intermedium beim Einbetten in Paraffin eingeführt, wird es in dieser Eigenschaft von manchen Forschern sehr warm empfohlen, ist aber nicht ohne gewisse Kautelen zu gebrauchen. S. hierüber unten § 137.

Auch beim Einschliessen der Celloidinschnitte ist es verwendbar (§ 168), noch mehr aber dient es zum Härten der Celloidinblöcke (§ 163).

Neuerdings wird es auch für Paraffinschnitte als Intermedium vor Balsam gebraucht. Da es indessen ungemein rasch verdunstet, so wird dabei leicht aus der Luft Wasser auf das Präparat niedergeschlagen. Genaueres in § 149.

131. Benzol, Toluol, Xylol. Von ihnen ist Benzol am flüchtigsten, dann kommt Toluol und zuletzt Xylol (im Verhältniss von 4 : 5 : 9, nach Squire, Methods p. 20). Als Intermedium beim Einbetten in Paraffin ist deshalb nur Benzol mit Vortheil verwendbar (Genaueres in § 138). Umgekehrt dient das relativ wenig flüchtige Xylol als Intermedium für Celloidinschnitte (allerdings nicht allein, sondern mit

Karbolsäure, Rizinusöl oder Anilin; s. § 168). Toluol wurde von HOLL (Z. Anzeiger 8. Jahrg. 1885 p. 223) in die Mikrotechnik eingeführt, scheint aber nur wenig verbreitet zu sein.

Das käufliche Xylol und Toluol werden in nicht vollen Flaschen nach einiger Zeit sauer; bei Benzol habe ich (MAYER) dies nicht bemerkt.

Alle drei Kohlenwasserstoffe sind gegen Wasser ungemein empfindlich, und man muss daher beim Uebertragen von ganzen Objekten oder Schnitten aus dem Alkohol sehr darauf achten, dass dieser möglichst wasserfrei sei. Um dies zu umgehen, kann man entweder Chloroform oder nach UNNA (Monatsh. Prakt. Dermat. 19. Bd. 1894 p. 231) ein Gemisch von Xylol und absolutem Alkohol zwischenschalten.

Nach WEIGERT (Centralbl. Allg. Path. 9. Bd. 1898 p. 291) ist es nur ein „sehr verbreitetes Vorurtheil“, dass zur „Aufhellung“ mit Xylol absoluter Alkohol nöthig sei. Weigert nimmt 94%igen Alkohol, muss sich aber dabei der von „W. H. Welch im Jahre 1876 erfundenen Abtupfungsmethode mit Filtrirpapierbäuschen“ bedienen. Es versteht sich von selbst, dass eine solche Behandlung lange nicht alle Präparate vertragen.

Ueber **Petroläther** und **Naphtha** s. § 137 und § 169 (SAMASSA).

6. Kapitel.

Allgemeines über das Einbetten. Mikrotome.

132. Etwas über Mikrotome. Obwohl es nicht unsere Absicht ist. die verschiedenen Instrumente zum Schneiden zu beschreiben, so sind doch vielleicht einige Worte darüber dem Anfänger willkommen. Zunächst das Gefriermikrotom: so nützlich es dem Pathologen oder auch dem praktischen Arzt sein mag, eben so wenig ist es doch im Allgemeinen für den Zoologen von Bedeutung. Zwar lassen sich damit in kürzerer Frist als mit irgend einem anderen Mikrotome recht dünne Schnitte machen, aber sie sind gewöhnlich nicht recht brauchbar. Die Lage der Theile in dem Schnitte verschiebt sich beim Frieren und noch mehr beim Aufthauen, und Schnittreihen lassen sich natürlich gar nicht damit machen In gewissen Fällen mag es jedoch von Nutzen sein (Genaueres s. § 179 ff.). Solger wenigstens rühmt es zum Schneiden frischer Speicheldrüsen sehr, aber das sind doch Ausnahmen.

Für die Zoologen und wohl auch für die Anatomen handelt es sich also um ein Mikrotom zum Schneiden eingebetteter Objekte. Nun schneidet man bekanntlich die Objekte in Paraffin stets trocken und häufig mit quergestelltem Messer, die in Celloidin hingegen gewöhnlich nass und immer mit schrägem Messer. In der Regel sind daher die Mikrotome für Paraffinschnitte nicht recht geeignet für Celloidinschnitte und umgekehrt. Ein gut eingerichtetes Laboratorium sollte mithin beide Arten von Instrumenten besitzen: die einen für das Trockenschneiden, die anderen für das Schneiden von Celloidin (und anderen Massen) unter Alkohol. Kann man aber nur für eins die Mittel aufbringen, so sollte man jedenfalls eins nehmen, das wenn auch theuer, so doch beiden Arten des Schneidens nach Möglichkeit gerecht würde.

Als ein solches Universalinstrument möchten wir in erster Linie das Schlittenmikrotom von R. Jung in Heidelberg empfehlen, und zwar das mittelgrosse Modell (No. 4) mit den neuesten Verbesserungen. Es ist zwar nicht billig, erlaubt aber das Schneiden von Paraffin sowohl mit querem als auch mit schrägem Messer, ebenso das Schneiden von Celloidin, da der Alkohol zum Befeuchten von Messer und Objekt dem Instrumente nicht schadet, wenn es nur nach dem Gebrauche wieder gut gereinigt wird.

Auch die Schlittenmikrotome von A. Becker in Göttingen sind sehr zu empfehlen; wie sich bei ihnen das Schneiden von Celloidin gestaltet, ist uns nicht bekannt.

Eine andere Kategorie von Mikrotomen beschränkt sich auf die Produktion von Schnittbändern durch Paraffin, arbeitet daher nur mit querem Messer und ist mithin nicht universell. Manches Objekt nämlich wird beim Einbetten in Paraffin stellenweise (je nach der Art des Gewebes) so hart, dass es sich zwar mit schrägem Messer noch ohne Mühe schneiden lässt, hingegen mit querem Messer nicht mehr: die Schnitte zerreissen an den Stellen, wo die harten Massen liegen, oder die harten werden durch die dahinter befindlichen weicheren hindurchgedrückt etc. Auf der anderen Seite gewährt diese Art von Instrumenten den Vortheil, dass sie ungemein viel rascher arbeiten als die Schlittenmikrotome. Verfügt man also über die Mittel, so kaufe man sich ausser einem Schlittenmikrotom eins für Schnittbänder, und hier wäre in vieler Beziehung zu empfehlen das sogenannte Schaukelmikrotom von Jung. Dieses ist ein verbessertes Cambridge Rocking Mikrotome und hat vor dem englischen so ingeniösen Original eine ganze Anzahl kleiner Vortheile voraus, die sich aus den Bedürfnissen der Praxis ergeben haben. Es theilt mit ihm den prinzipiellen Fehler, dass es keine geraden Flächen schneidet, sondern Stücke eines Cylindermantels. Zwar ist bei kleinen Objekten, wie sie meist dem Zoologen vorkommen, die Krümmung noch so unbedeutend, dass sie vernachlässigt werden darf, indessen wer hierauf Werth legt, möge sich des von Minot angegebenen Instrumentes bedienen. Dieses scheint allerdings an Genauigkeit der Ausführung hinter dem Schaukelmikrotom zurückzustehen; ich (Mayer) empfehle übrigens nicht das von E. Zimmermann in Leipzig, weil es trotz des hohen Preises nicht exakt genug arbeitet, sondern die Form, in der es A. Becker in Göttingen liefert. (Die beiden neuesten Modelle von Cambridge, die ebenfalls gerade Flächen schneiden, sind uns bisher nur aus der Ankündigung ihrer Verfertiger bekannt.)

Auf eine Besprechung der grossen und theueren Instrumente von Giltay und von Strasser glauben wir verzichten zu dürfen. Auch auf die zahlreichen kleineren, wie das von Hatschek, Schaffer etc., wollen wir nicht näher eingehen, sondern verweisen den Leser auf die Beschreibungen in der Zeit. Wiss. Mikr.

Schneideapparate für uneingebettete Membranen, Keimscheiben etc. sind schon sehr früh von Hensen (Arch. Mikr. Anat. 2. Bd. 1866 p. 46), neuerdings von Virchow (Zeit. Wiss. Mikr. 17. Bd. 1899 p. 295) und Schaffer (ibid. 1900 p. 417) empfohlen worden.

133. Methoden zum Einbetten. Man bettet gegenwärtig ein Objekt nur noch selten deswegen ein, um es aussen mit einer plastischen Masse zu umgeben, die es ohne schädlichen Druck festhalten soll, sodass man beim Schneiden durch die Einbettmasse zugleich Schnitte vom Objekt erhält. Sondern man füllt zugleich mit dieser Masse die natürlichen Hohlräume im Objekte so gut aus, dass alle Organe, ohne Verschiebungen zu erleiden, auf dem Schnitte in situ erhalten bleiben; und nicht nur dies, sondern die Masse soll auch alle Zellen oder sonstige anatomische Elemente erfüllen, damit die Gewebe eine Konsistenz erlangen, die sie sonst nicht haben würden, und die dafür

bürgt, dass in den Schnitten auch die kleinsten Theilchen ihre natürliche Lage beibehalten haben.

Das erwähnte Ziel erreicht man gewöhnlich auf zwei Wegen: entweder wird das Objekt mit einer Masse durchtränkt, die in der Wärme flüssig ist, kalt hingegen hart; oder mit einer Substanz, die zwar in Lösung flüssig genug ist, um einzudringen, dagegen nach Verdunstung oder sonstiger Entfernung des Solvens zugleich mit dem Objekte hart genug wird, um geschnitten werden zu können. In beiden Fällen heisst das Material zum Einbetten die Einbettmasse, und man unterscheidet also warme Massen (Paraffin etc.) und kalte Massen (Celloidin etc.). Wie schon oben § 7 gesagt, ist die gebräuchlichste Methode die des Einbettens in Paraffin.

134. Gefässe zum Einbetten und ihre Anwendung. Obwohl man zum Einbetten in Paraffin oder Celloidin etc. so ziemlich jede flache Glasschale oder auch ein Uhrglas oder ein Gefäss aus einem Metall, das von den Massen nicht angegriffen wird, verwenden kann, so hat man doch (besonders für das Paraffin) auch eigene Behälter aus Papier oder Formen aus Metall in Gebrauch. In ein solches Papierkästchen nun (wie man es anfertigt, s. unten) giesst man etwas von dem flüssigen Paraffin hinein; sobald dieses gerade so weit abgekühlt und dicklich geworden ist, dass das Objekt nicht mehr hindurch zu Boden sinken würde, wird letzteres in das Kästchen gebracht und noch so viel Paraffin hinzugegossen, bis es ganz davon umgeben ist. Oder man stellt das Kästchen auf ein Stück Kork, legt das Objekt hinein, fixirt es in seiner Lage durch Stecknadeln, giesst erst jetzt die geschmolzene Masse hinein und zieht die Nadeln heraus, wenn die Masse kalt ist.

In beiden Fällen muss natürlich vor dem Schneiden die Papierform von der Masse entfernt werden.

Auch für Celloidin oder Gummi etc. sind diese Formen aus Papier verwendbar.

Giesbrecht nimmt (nach mündlicher Angabe an Mayer) statt des Papieres zu den Kästchen Stücke dünner Filmrollen. Diese erlauben bei ihrer Durchsichtigkeit das Orientiren der Objekte unter dem Präparirmikroskope.

Papierkästchen macht man wie folgt. Ein Stück Papier *ABCD* von der Form, wie sie der Holzschnitt (Fig. 1) angibt, faltet man längs der Linien *ab* und *cd*, klappt die Falten wieder zurück und faltet es längs *ef*. Diese neue Falte lässt man aber bestehen (Fig. 2), schlägt das Dreieck *egi* längs *gi* so um,

dass *e* nach *l* zu liegen kommt, verfährt mit dem Dreieck *fhk* ebenso und klappt zuletzt das Stück *CDgh* längs *gh* um (Fig. 3). Nun macht man die nämlichen Operationen am anderen Ende des Papieres, bildet also die Falte *no* (Fig. 2), die Dreiecke *Apa* und *Bcq* etc. Hebt man endlich die Falten *gh* und *no* in die Höhe und drückt die Ecken *i* und *k* (nebst den entsprechenden am anderen Ende) etwas ein, so ist das Kästchen fertig. Ein Stück Papier von 100×60 mm ergibt, wenn man die Wände 15 mm hoch macht, ein Kästchen mit einer Grundfläche von 30×50 mm. Löst man nach dem Erkalten des Paraffins das Papier vorsichtig ab, so kann man dasselbe Kästchen nochmals gebrauchen.

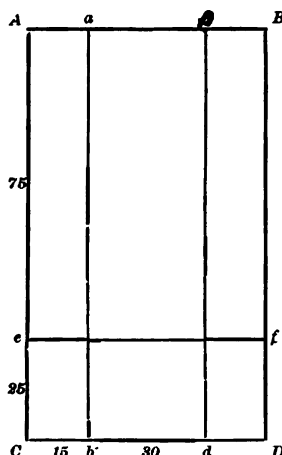


Fig. 1.

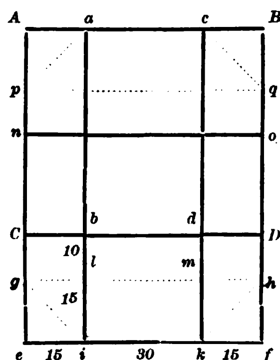


Fig. 2.

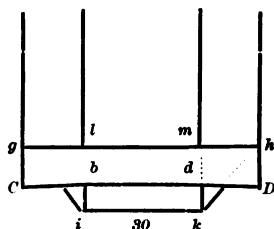


Fig. 3.

Zu Papierkapseln nimmt man einen guten Kork, windet einen Papierstreifen mehrere Male herum, aber so, dass er auf der einen Seite vorsteht, und steckt eine Nadel durch das Papier in den Kork. Hat man mit Celloidin oder ähnlichen Massen zu thun, so beschwert man den Kork unten mit Blei, damit er nicht schwimmt, wenn er zum Härten in Alkohol oder eine Flüssigkeit gelegt wird.

Am bequemsten sind für Paraffin die **Formen aus Metall**: sie bestehen aus Messing, weniger gut aus Lettermetall, und haben die Form von zwei rechten Winkeln ; als Boden dient eine Glasplatte, die zuvor ganz dünn mit Glycerin bestrichen (man verreibt einen Tropfen darauf mit dem Finger) und etwas erwärmt wird. Natürlich lässt sich durch Verschieben der beiden Metallstreifen aneinander die Länge des Raumes für das Paraffin variiren, nicht jedoch Breite und Höhe; man kommt aber gewöhnlich mit einem Paar Streifen von 1 cm und einem Paar von 2 cm Höhe

aus; sie mögen 8 cm lang und 3 cm breit sein. Da sich das Paraffin beim Eingiessen in die Form an den Metallstreifen abkühlt, so fliesst, wenn man es nicht allzu hoch erhitzt hat, nichts davon aus, und man behält doch in der Regel Zeit genug, um die Objekte in dem noch warmen Paraffin nach Wunsch zu orientiren (am besten parallel den Streifen). Uebrigens thut man auch hier wie bei den Papierkästen gut daran, zunächst etwas reines Paraffin einzugiessen und erst nachher die Objekte hineinzubringen, damit sie nicht unmittelbar auf das Glas zu liegen kommen.

Die Formen aus Messing sind zuerst von ANDRES, GIESBRECHT & MAYER (Mitth. Z. Stat. Neapel 4. Bd. 1883 p. 436) beschrieben worden und haben sich gut bewährt. — FRANKL (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1897 p. 438) empfiehlt als einfachstes und billigstes Hülfsmittel zum Einbetten geschliffene Glasklötze, die ja recht praktisch sein mögen, jedenfalls aber relativ theuer sind.

Um die Einbettformen paraffindicht zu machen, sodass man die Objekte darin noch beliebig lange Zeit im flüssigen Paraffin belassen kann, bestreicht man nach MAYER (l. c.) die Glasplatte dünn mit Glycerin, legt die beiden Metallstreifen darauf, giesst das so entstandene Kästchen voll Kollodium, leert es aber sofort wieder aus. Dann bleibt nach dem Verdunsten des Aethers eine ganz feine Schicht Kollodium zurück, die kein Paraffin durchlässt. Man muss nur dafür Sorge tragen, dass man die beiden Streifen nicht aus ihrer Lage bringt.

Auch SELENKA (Z. Anzeiger 8. Jahrg. 1885 p. 419) hat einen kleinen Apparat zum Einbetten angegeben. Er besteht aus einer in der Mitte zu einem Näpfchen vertieften Glasröhre, durch die sich warmes oder kaltes Wasser leiten lässt; Paraffin und Objekte kommen in das Näpfchen. Der Apparat gestattet es, die Einbettung unter dem Präparirmikroskop vorzunehmen.

Eine Modifikation hiervon beschreibt ANDREWS (Amer. Natural. Vol. 21 1887 p. 101; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 375): es ist eine Flasche von rechtwinkligem Querschnitt, mit einem Zu- und Ableitrohr für Wasser; die Flasche liegt horizontal und trägt oben ein Rechteck aus Glasstreifen aufgekittet, in das man das Paraffin giesst. Man lässt erst warmes Wasser durch die Flasche strömen, bis man das Objekt im flüssigen Paraffin orientirt hat, und kühlt dieses dann rasch ab, indem man kaltes Wasser durchlaufen lässt.

135. Einbetten ganz kleiner Objekte. Hierzu dienen am besten Gefässe, die unten nicht flach sind, sondern einen nach aussen so stark konvexen Boden haben, dass die Objekte sich dort in der Mitte leicht ansammeln können, also im einfachsten Falle Uhrgläser. Handelt es sich um Einbettung in Paraffin, so schmilzt man dieses im Uhrglase und gibt dann die Objekte hinein; oder man bringt die mit dem Intermedium durchtränkten Objekte nebst Stücken von

Paraffin hinein und erwärmt hinterher. Jedenfalls lässt man nun die Masse erkalten und schneidet mit einem dünnen, leicht erwärmten Messer das Stück heraus, worin die Objekte sitzen (geht natürlich auch mit Celloidin!). Oder man schiebt erst das ganze Paraffin aus dem Glase heraus und schneidet es dann in die gewünschten Stücke; in diesem Falle thut man gut daran, das Uhrglas vor der Benutzung innen mit einem Minimum von Glycerin oder Nelkenöl sorgfältig einzureiben.

Borgert (Zeit. Wiss. Z. 63. Bd. 1897 p. 144) lässt ganz reines Paraffin in einem Uhrglase erstarren, bohrt in der Mitte ein kleines Loch bis auf das Glas, gibt in diese Grube die Objekte mit etwas Benzol und setzt das Glas auf kurze Zeit in den Paraffinofen. Das Paraffin löst sich, wenn das Glas innen ganz sauber war, in kaltem Wasser los. — Lauterborn (Zeit. Wiss. Z. 59. Bd. 1895 p. 170) bringt die Objekte aus dem Alkohol in ein sehr kleines Reagensgläschen, bettet sie in diesem durch Chloroform in Paraffin ein und zerschlägt zuletzt das Glas; er hat sie dann alle auf ganz engem Raum beisammen eingebettet. — S. auch unten § 578 die Methode von Boveri etc., sowie § 875 die von Hoyer und Schaudinn.

Samter (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 469) durchdränkt kleine ungefärbte Objekte, um sie beim Einbetten nicht zu verlieren, mit Paraffin, das vorher mit Alkanna-Extrakt stark roth gefärbt worden ist, und bringt sie beim Einbetten in ungefärbtes Paraffin. Die Objekte selber nehmen die Farbe nicht an. — Rhumbler (ibid. 13. Bd. 1896 p. 303) färbt die Objekte aus dem gleichen Grunde schwach mit Eosin (in starkem Alhohol) vor und entfernt dieses aus den Schnitten durch Auswaschen mit schwachem Alkohol.

Ueber das Orientieren sehr kleiner Objekte (Infusorien, Wurmlarven, Eier mancher Seethiere etc. etc.) s. unten § 142.

136. Wahl der Methode. Unter den Methoden für das Einbetten ragen nur zwei besonders hervor: die Paraffinmethode und die Celloidinmethode.

Ueber die Vorzüge oder Nachtheile dieser beiden ist viel debattirt worden. Indessen scheint einstweilen die Sache noch einfach zu liegen: Celloidin gestattet in der Regel nicht so dünne Schnitte zu machen, wie sie nach den Ansprüchen der modernen Zootomie nöthig sind, und so muss man in solchen Fällen Paraffin nehmen. Auf der anderen Seite kann man selbst in Paraffin sehr dünne Schnitte doch nur von kleinen Objekten gewinnen; sind letztere schon reichlich über 1 cm im Durchmesser, so schneiden sie sich in Celloidin wohl ebenso dünn; und wenn sie erst $2^1/_2$ cm im Durchmesser erreichen oder noch mehr, so bekommt man in Paraffin gute Schnitte nur noch unter besonderen Bedingungen. Im Allgemeinen würde also für

sehr grosse Objekte das Celloidin vorzuziehen sein. Es muss aber gleich hinzugefügt werden, dass die gesammten Manipulationen (Einbetten, Schneiden und Behandeln der Schnitte) beim Celloidin viel länger dauern und auch grössere Ansprüche an die Geschicklichkeit und Aufmerksamkeit des Forschers stellen als beim Paraffin; wer sich also über den Bau eines Objektes rasch und relativ ohne Mühe durch Schnitte orientiren will, wird ohne Zweifel zum Paraffin greifen.

Dass die Gewebe bei gleich sorgfältiger Behandlung im Celloidin weniger leiden als im Paraffin, wird zwar oft behauptet, ist uns aber keineswegs erwiesen. Auch hier gibt es natürlich besondere Fälle, wo man nur die eine oder nur die andere Einbettmasse wählen darf; so z. B. ist Celloidin nicht rathsam für schwer durchdringliche Objekte, Paraffin hingegen wenig zu empfehlen für solche, die leicht schrumpfen. Indessen hängt selbst hierbei so sehr viel — oder vielleicht Alles — vom Geschick und von der Geduld des Operators ab, dass sich allgemein gültige Sätze kaum formuliren lassen.

Dass sich wirklich grosse Schnitte auch durch Paraffin erhalten lassen, zeigen die Erfahrungen von STRASSER (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 7), der sogar Serien von Frontalschnitten von 30 μ Dicke durch ein ganzes Menschenhirn (Blöcke von 10 × 15 Ctm. Fläche) macht (s. § 686). Es kann es nur nicht Jeder, auch gehören dazu besondere Einrichtungen.

In ganz speziellen Fällen leisten auch Gummi, Seife oder Gelatine gute Dienste.

Ueber das Einbetten zum Schleifen von Objekten s. unten § 175, über das Einbetten für Eisschnitte § 179.

7. Kapitel.

Einbetten in Paraffin und andere warme Massen.

A. Paraffin.

137. Durchtränken mit dem Intermedium. Das erste Stadium im Einbetten besteht im Durchtränken des gut entwässerten Objektes mit einer Substanz, die ein Solvens des Paraffins ist. Es muss sorgfältig geschehen, wie § 111 vorgeschrieben. Der Intermedien hierzu sind zahlreiche empfohlen worden: Terpentinöl, Nelkenöl, Bergamottöl, Kreosot, Benzol, Xylol, Toluol, Petroleumäther, Cedernöl, Chloroform, Anilin etc., nur sind sie nicht alle gleich brauchbar.

Terpentinöl dringt zwar gut ein und mischt sich leicht mit Paraffin, schadet aber der feineren Struktur der Objekte sehr. Nelkenöl dringt zwar ebenfalls gut ein, mischt sich aber nur ganz unvollkommen mit Paraffin und macht ausserdem die Gewebe rasch brüchig. Benzol ist von Brass empfohlen worden. Toluol von Holl (Z. Anzeiger 8. Jahrg. 1885 p. 223). Naphtha (Benzinum petrolei, Steinöl) von Webster (Journ. Anat. Phys. London Vol. 25 1891 p. 278), Petroläther von Field & Martin (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 10), sowie von Wlassak (Arch. Entwickelungsmech. 6. Bd. 1898 p. 466), Methylsalicylat von Guéguen (s. oben § 126). Xylol soll nach Heidenhain (Festschr. Kölliker Leipzig 1892 p. 114) die Zellen zum Schrumpfen bringen; er gebraucht Bergamottöl. Dieses ist nun wieder nach Apáthy (Mikrotechnik p. 117) gar nicht zu empfehlen.

Nach Apáthy (s. Behrens, Tabellen 3. Aufl. 1898 p. 28) lösen sich von Paraffin (Schmelzpunkt 57--58°) bei 20° C. in Benzol 8, Chloroform 11, Toluol 10, Xylol 12, Terpentinöl 8%, dagegen in Cedernöl nur 4—6 (in eingedicktem sogar nur 1), Thymianöl 4—6, Bergamottöl $^1/_2$– 3% und in Kreosot und Nelkenöl fast gar nichts. Dies gibt, obwohl natürlich bei höherer Temperatur die Zahlen ganz anders sein werden, wenigstens einen Anhaltpunkt zur Beurtheilung der Intermedien.

Ernstlich in Betracht kommen, wenn nicht ganz spezielle Anforderungen gestellt werden, z. B. dass das Intermedium das osmirte Fett nicht ausziehen oder zarte Färbungen nicht angreifen soll, von dieser ganzen Schaar nur drei: Benzol, Cedernöl und Chloroform.

Das Chloroform mischt sich gut mit Paraffin und hinterlässt nach dem Verdunsten im Paraffinbade (§ 138) ein reines und sehr homogenes Paraffin, das nur wenig Neigung zum Kristallisiren zeigt. Aber es dringt nicht leicht ein und erfordert deswegen bei etwas grossen Objekten viel Zeit; und man muss es auch durch Verdampfenlassen äusserst sorgfältig entfernen, denn wenn selbst nur eine Spur davon zurückbleibt, so schneidet sich das Paraffin nicht gut. Aber die Entfernung kostet viel Zeit, unter Umständen sogar Tage; Apáthy hat denn auch dafür besondere Apparate gebaut (s. Mikrotechnik p. 150). Uns will es daher geboten erscheinen, die Anwendung des Chloroforms auf kleine, leicht durchdringbare Objekte zu beschränken.

Aus den Gründen, die ich (Lee) schon früher auseinandergesetzt habe, halte ich auch jetzt noch das Cedernöl im Allgemeinen für das beste Intermedium zur Einbettung in Paraffin. Es dringt sehr rasch ein, erhält die zarten Gewebe am besten von allen mir bekannten Mitteln, macht die Objekte nicht brüchig, auch wenn man sie Wochen oder Monate lang darin lässt, und gewährt ausserdem noch den Vortheil, dass es selbst bei nicht vollkommener Entfernung aus den Geweben im Wasserbade (§ 138) doch die Schneidfähigkeit des Paraffins nicht ernstlich schädigt; ja, ich glaube, es bessert sie mitunter, indem es die Brüchigkeit verringert.

Zwischen den beiden so eben erwähnten Arten der Einbettung bildet die Apáthysche gewissermaassen die Brücke. Apáthy nämlich (Mikrotechnik p. 149) bringt die Objekte aus dem absol. Alkohol nach der Methode von Mayer oder Giesbrecht (§ 111) in reines Cedernöl, benutzt dessen aufhellende Wirkung dazu, sie in toto zu studiren, zu messen und zu zeichnen, führt sie dann ebenso behutsam in eine kalt gesättigte Lösung von Paraffin (Schmelzpunkt 55° C.) in Chloroform über, erwärmt sie 1—3 Stunden später darin auf etwa 60°, legt sie auf mehrere Stunden in reines Paraffin von 55° C. und bettet sie zuletzt ein. Ueber die Gründe zu dieser Komplikation lässt sich Apáthy nicht aus; vielleicht ist der einzige der, dass des Zeichnens wegen das Objekt erst wirklich aufgehellt werden muss, aber das würde doch wohl nur relativ selten nöthig sein.

Benzol endlich hat Brass (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 301) als gutes Intermedium empfohlen, und ich (Mayer) schliesse mich ihm darin völlig an. Genaueres hierüber s. in § 138.

Die Methode von Carnoy & Lebrun, um das Brüchigwerden des Dotters beim Einbetten zu verhüten, s. unten § 590, die ähnliche von van der Stricht § 629.

In einigen schwierigen Fällen (§ 129) ist Anilin zu nehmen. Strasser verwendet für seine Riesenschnitte Karbolxylol (s. § 686).

Ueber die Qualität des Paraffins s. unten § 150.

138. Ueberführen in Paraffin. Einige Autoren legen grossen Werth darauf, den Uebergang vom Intermedium zum Paraffin so langsam wie möglich zu machen, indem sie das Objekt nach einander in verschiedene Gemische von beiden bringen, die bei niedriger Temperatur (etwa 35° C.) geschmolzen bleiben. Das ist aber jedenfalls bei Cedernöl nicht nöthig; hier können die Objekte einfach in Paraffin gebracht werden, das gerade am Schmelzen erhalten wird, und darin bleiben sie so lange, bis sie ordentlich durchtränkt sind. Dabei wird aber das Paraffin ein oder zwei Mal gewechselt, wenn die Objekte so voluminös sind, dass sie eine beträchtliche Menge vom Intermedium mit sich geführt haben.

Verwendet man Chloroform, so bieten sich zwei Wege dar: entweder erwärmt man nach Giesbrecht das Chloroform mit dem Objekte bis zum Schmelzpunkt des Paraffins, setzt dieses allmählich zu und hält die ganze Masse in derselben Wärme solange, bis alles Chloroform entwichen ist; oder man bringt nach Bütschli (Biol. Centralbl. 1. Jahrg. 1881 p. 591) die Objekte vom Chloroform in ein bei 35° gesättigtes, also bei Zimmertemperatur festes Gemisch von diesem und Paraffin, lässt sie bis zur völligen Durchtränkung (1/2 Stunde) darin und treibt nun das Chloroform langsam bei 40—50° C. aus; grössere Objekte aber, wo das völlige Abdunsten des Chloroforms sehr lange dauern könnte, bringt man direkt aus dem Gemisch in reines Paraffin.

Giesbrechts Methode (Z. Anzeiger 4. Jahrg. 1881 p. 484) ist mehr im Einzelnen wie folgt. Die Objekte kommen aus dem absoluten Alkohol in Chloroform, dem eventuell etwas Aether zugesetzt ist, um das Schwimmen der Objekte zu verhüten. Sobald sie sich damit gut durchtränkt haben, wird Alles zusammen bis zum Schmelzpunkte des Paraffins erwärmt, und zugleich werden allmählich kleine Stücke Paraffin hineingeworfen. Sobald man keine Gasblasen mehr aus den Objekten aufsteigen sieht, hört man mit dem Zusatz von Paraffin auf, denn das ist ein Zeichen davon, dass das Chloroform ganz durch Paraffin verdrängt ist. Da aber dies allmählich geschieht, so wird die Schrumpfung der Gewebe auf ein Minimum reduzirt.

Aehnlich wie Bütschli verfährt Heidenhain (Festschr. Kölliker Leipzig 1892 p. 114), nur nimmt er Bergamottöl, und zwar erst ein Gemisch von diesem und absolutem Alkohol zu gleichen Theilen, dann reines Oel, darauf Oel und Paraffin, dann Paraffin von 45°, endlich solches von 58° Schmelzpunkt; sind die Gewebe vorher sorgfältig behandelt worden, so leiden sie bei 60° C. gar nicht.

Rabl (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 164) bettet aus Chloroform oder Bergamottöl ein: er bringt das Objekt zunächst aus dem absol. Alkohol allmählich in eins von diesen Intermedien, dann bei 50° C. in Paraffin von 45°

Schmelzpunkt, bis jede Spur des Intermediums entfernt ist, endlich auf kurze Zeit in ein solches von 56°, das aber vorher auf 80—90° erwärmt worden ist.

Ueber Apáthys Methode mit Cedernöl und Chloroform s. oben p. 86.

Mit Benzol als Intermedium bettet MAYER (1. Auflage dieses Buches p. 78) seit vielen Jahren wie folgt ein. Die Objekte bringt er aus dem absol. Alkohol je nach ihrer Konsistenz rascher oder langsamer in Benzol, wechselt dieses 1 oder 2 Mal, um sicher allen Alkohol entfernt zu haben, gibt dann einige Stückchen des definitiven Paraffins (meist von 58—60° Schmelzpunkt) hinzu und lässt es sich bei gewöhnlicher Temperatur lösen. Nach mehreren (bis zu 18) Stunden stellt er Objekte und Flüssigkeit in einem offenen Gefässe in das kalte Wasserbad, erwärmt dieses ganz allmählich (in etwa 2 Stunden) auf 60° C., giesst in dem Maasse, wie das Benzol verdampft, geschmolzenes Paraffin nach und wechselt zum Schluss das Paraffin nochmals ganz, ehe er zum Einbetten schreitet. Ueber Nacht lässt er nur ausnahmsweise ein Objekt im Wasserbade.

Letztere Bemerkung scheint mir (Mayer) insofern nicht überflüssig, als es in manchen Laboratorien Sitte ist, das Wasserbad für das Paraffin Tag und Nacht angeheizt zu halten. Dies verführt leicht dazu, auch die Objekte recht lange im geschmolzenen Paraffin zu belassen, in vielen Fällen bestimmt ohne guten Grund, lediglich aus Bequemlichkeit.

Die Dauer des Bades richtet sich selbstverständlich nach Art und Grösse des Objektes. Ein Embryo von 2—3 mm im Durchmesser kann in einer Stunde gut durchtränkt sein, oft auch schon eher, wenn er vorher in Cedernöl gewesen ist. Jedenfalls muss man die Objekte, sobald sie durchtränkt sind, rasch abkühlen (§ 141). Lässt man sie nämlich zu lange im Bade, so können zarte Gewebe stark leiden. Denn worauf es hier am meisten ankommt, ist: die Wirkung der Hitze möglichst gering zu gestalten. Daher sollte man denn auch nicht nur das weichste Paraffin nehmen, das gerade noch gute Schnitte gibt, sondern auch das Bad so kurz wie möglich dauern lassen.

Wichtig ist es ferner, das flüssige Paraffin vor Wasserdämpfen zu schützen. Noch wichtiger aber ist es, es so nahe wie möglich am Schmelzpunkt zu halten. Wird es nämlich eine Zeit lang beträchtlich höher erhitzt, so steigt sein Schmelzpunkt, und man bekommt also, ohne es zu wollen, ein härteres Paraffin. Und für die gute Erhaltung der Gewebe ist es natürlich vortheilhaft, sie so wenig wie möglich zu erhitzen.

Ueber die Qualität des Paraffins s. unten § 150.

139. Luft- und Wasserbäder. Das Paraffin darf, während es flüssig ist, durchaus nicht mit Wasserdampf in Berührung kommen. Verwendet man daher ein Wasserbad beim Einbetten, so muss man hierauf Rücksicht nehmen.

In der Zeit. Wiss. Mikr. findet man eine ganze Anzahl Wasserbäder und Luftbäder für Heizung mit Gas, Alkohol, Petroleum etc. beschrieben. Von ihnen gilt wie auch sonst überall: je einfacher, desto besser! Auch hängt ungemein viel von der Geschicklichkeit des Forschers ab: man glaubt z. B. neuerdings, ohne Thermostaten nicht auskommen zu können, und doch lässt sich mit einer einfachen Spirituslampe, deren Docht man möglichst niedrig schraubt und vor Zug schützt, die Temperatur des Paraffins konstant genug erhalten.

140. Durchtränken bei vermindertem Luftdruck. Für Objekte, die sich wegen ihrer Grösse oder Konsistenz selbst in mehreren Tagen nicht auf die gewöhnliche Art mit Paraffin durchtränken lassen, ist das Einbetten bei vermindertem Druck äusserst wichtig. Es sichert nämlich nicht nur das vollständige Eindringen des Paraffins schon in wenigen Minuten, sondern verhindert auch das Zusammenfallen der Gewebe, wie es bei Objekten mit grossen Hohlräumen im Innern vorkommen kann, wenn man sie nach der gewöhnlichen Weise einbettet, und lässt sich einfach durch irgend eine Vorrichtung bewirken, die das Paraffin unter der Luftpumpe flüssig hält. So erzeugt HOFFMANN (Z. Anzeiger 7. Jahrg. 1884 p. 230) das Vacuum durch eine Wasserluftpumpe, wobei das Gefäss mit dem Paraffin in einem Exsiccator steht, der in einem Wasserbade warm erhalten wird und mit der Pumpe durch ein Rohr verbunden ist. Das geht bequem und sicher, falls man nur den nöthigen Druck in der Wasserleitung hat. — Ferner hat FRANCOTTE (Bull. Soc. Belg. Micr. 1884 p. 45) einen Apparat angegeben, wobei das Vacuum durch Kondensation von Wasserdampf hervorgebracht wird; ebenso GARBINI (Manuale Tecn. Micr. 4a Ediz. Verona 1899 p. 148). — FOL (Lehrbuch p. 121) verwendet den Apparat von Hoffmann in etwas einfacherer Form: das Paraffin ist in einem weiten Reagensglase enthalten, durch dessen Kautschukpfropfen ein Rohr zur Verbindung mit der Pumpe geht: das Reagensglas taucht in ein Wasserbad ein. Man pumpt die Luft 1 oder 2 Mal aus, wartet einige Minuten, um sicher zu wissen, dass keine Luftblasen mehr aufsteigen, lässt dann die Luft ein, giesst das Paraffin aus (Fol giebt an, es sei inzwischen schwer schmelzbar geworden) und bettet das Objekt in frisches Paraffin um.

141. Einbetten und Abkühlen. Sobald die Objekte gut mit Paraffin durchtränkt sind, müssen sie nach einer der oben angegebenen Methoden (§ 134) eingebettet werden, wenn man sich nicht etwa von vorne herein eines Uhrglases oder eines anderen paraffindichten Gefässes bedient hat, was jedoch in der Regel nicht der Fall sein wird. Immer aber ist es äusserst wichtig, das Paraffin so rasch wie möglich abzukühlen, damit es nicht auskristallisiren kann (dies kommt bei langsamem Erkalten leicht vor), sondern eine möglichst homogene Masse bildet. Hat man also mit dem Uhrglas gearbeitet,

so lässt man dieses mit den Objekten darin auf kaltem Wasser schwimmen; aber es darf erst dann untergetaucht werden, wenn das Paraffin auch oben hart geworden ist. Später schneidet man die Blöcke mit den Objekten heraus, und zwar mit einem nur leicht erwärmten Messer. — Die Papierkästchen lässt man ebenfalls auf Wasser schwimmen und gleichfalls erst dann untertauchen, wenn das Paraffin auch oben hart geworden ist, sonst bekommt man leicht Höhlungen voll Wasser im Paraffin. Dasselbe gilt von den Formen aus Metall.

Selenka lässt durch sein Glasrohr (oben p. 82) kaltes Wasser fliessen; ähnlich verfährt Andrews. — Ein kleines transportables Wasserbad hierfür hat Mayer angegeben (Mitth. Z. Stat. Neapel 4. Bd. 1883 p. 436; Internation. Monatschr. Anat. Hist. 4. Bd. 1887 p. 39); er benutzt es in Verbindung mit seinen paraffindichten Formen (oben p. 82) und kann damit auch unter dem Präparirmikroskope bei auf- oder durchfallendem Lichte einbetten, was für kleine Objekte vortheilhaft werden mag. Haben diese ihre definitive Lage erhalten, so lässt er durch das Wasserbad kaltes Wasser strömen, sodass das Paraffin ohne irgend welche Erschütterung rasch erstarrt.

Kleine Objekte kann man zur Noth auch wie folgt einbetten. Mit einem warmen Spatel nimmt man sie aus dem flüssigen Paraffin, befreit sie mit Fliesspapier vom überschüssigen Paraffin und legt sie auf einen Paraffinblock. Dann erhitzt man eine Nadel oder einen Draht in einer Flamme und schmilzt damit ein Loch in den Block; endlich schiebt man das Objekt in das geschmolzene Paraffin hinein und legt es darin nach Belieben zurecht. Diese Methode ist sehr einfach, auch kann man nach ihr das Objekt direkt auf dem Objekthalter des Mikrotoms oder unter dem Präparirmikroskop einbetten. Indessen muss man sich ja davor hüten, das Paraffin beim Schmelzen zu überhitzen oder gar das Objekt mit der heissen Nadel zu ruiniren.

Bei sorgfältigem Verfahren darf der Paraffinblock wenigstens nahe beim Objekte keine Blasen, Höhlen etc. zeigen, sondern muss ganz homogen sein. Ist das nicht der Fall, so kann man versuchen, mit einer heissen Nadel, die man in die fehlerhaften Stellen einsticht, dem abzuhelfen; sind die Schäden aber schlimmer, so wird man vor dem Ausschmelzen der Objekte und dem nochmaligen Einbetten nicht zurückschrecken dürfen, weil man sonst nie gute Schnitte bekommen kann. Zeigen sich ferner während des Schneidens im Objekte Lücken, so muss man diese, so gut es geht, mit geschmolzenem Paraffin ausfüllen. Man nimmt dazu wohl am besten einen kleinen Spatel, legt einige Brocken Paraffin darauf, schmilzt sie und giesst die flüssige Masse auf die Schnittfläche; eventuell muss man mit einer warmen Nadel behutsam die Luftblasen aus den Lücken hervorzutreiben suchen. Aber auch trotz aller Vorsicht wird man stets wenigstens

den ersten Schnitt nicht in der gewünschten Dicke erhalten oder ihn sogar ganz einbüssen.

Einige Forscher geben an, man solle zarte Objekte recht bald nach dem Einbetten schneiden, da das Paraffin selbst nach raschem Erkalten doch noch langsam Kristalle bilden könne. Aber diese Gefahr wird durch wirklich gutes Abkühlen sehr vermindert und ist nach unseren Erfahrungen gar nicht einmal vorhanden. Wie schon in der Einleitung (p. 5) erwähnt, kennen wir kein besseres Mittel zur Aufbewahrung der Gewebe als das Paraffin.

142. Orientiren. **Die oben beschriebenen Manipulationen genügen in den meisten Fällen zur definitiven Einbettung. Indessen ist es mitunter erwünscht, dem Objekt im Paraffinblock eine ganz bestimmte Lage geben und es auch von aussen in dieser bequem erkennen zu können. Von den Methoden zu diesem Zwecke seien hier folgende angeführt, bei denen es sich wesentlich um kleine Objekte (Eier, Keimscheiben etc.) handelt.**

Patten (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 13) nimmt Schreibpapier mit zwei Systemen erhabener paralleler Linien (Rippen), die sich unter rechten Winkeln kreuzen; hiervon schneidet er schmale Streifen und setzt darauf längs einer dieser Rippen in angemessenen Abständen Tröpfchen eines honigdicken Gemisches von Kollodium und Nelkenöl. Die Objekte sind vorher schon mit Nelken- oder Bergamottöl (nicht Terpentinöl) durchtränkt worden, werden dann eins nach dem anderen auf einem spitzen Messer herausgeholt und nach dem Absaugen des überschüssigen Oels mit Filtrirpapier jedes in einen von den Tropfen befördert. Hierin können sie unter dem Präparirmikroskop orientirt werden und behalten dann ihre Lage bei. Hat man nun 1/2 Dutzend oder mehr so orientirt, dass die spätere Schnittebene den Querrippen parallel läuft, so versenkt man das Papier in Terpentinöl, das das Nelkenöl (Bergamottöl) verdrängt und die Objekte auf dem Papier ordentlich festklebt. Darauf wandert das Papier in das Paraffinbad und wird zuletzt wie gewöhnlich eingebettet. Nach dem Abkühlen unter Wasser wird der Block zurechtgeschnitten und das Papier abgezogen; es bleiben aber nun zur Orientirung die Abdrücke der Rippen auf dem Paraffin zurück, desgleichen irgend welche Zahlen etc., die man vor dem Einbetten mit weichem Bleistift auf das Papier geschrieben hatte.

Knower (Journ. Morph. Boston Vol. 16 1900 p. 507) verwendet statt des Terpentinöls Xylol und statt des bereits linirten Papieres glattes, worin er mit einer Nadel parallele Rillen eingräbt. — Etwas komplizirtere Verfahren beschreiben Woodworth (Bull. Mus. Harvard Coll. Vol. 25 1893 p. 45) und Drew (Z. Anzeiger 23. Bd. 1900 p. 170). — Field & Martin (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 11) nehmen statt des Papiers schmale Streifen von Gelatine; im Uebrigen ähnlich wie Patten. — Die Methode von Schydlowski (ibid. 13. Bd. 1896 p. 200) ist keiner allgemeinen Verwendung fähig, ebensowenig wohl auch die von Noack (ibid. 15. Bd. 1899 p. 438).

Samter (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1897 p. 441) hat eine allerdings auch nicht gerade einfache Art für kleine kugelige Objekte angegeben, die aber

praktisch zu sein scheint. Er spannt ein Stück Eihaut von einem Hühnerei trocken auf einen kleinen Metallrahmen, der hierfür oben einige Stecknadelspitzen trägt, sticht mit einer Nadel in geeigneten Abständen feine Löcher in die Haut, gibt von unten her in jedes Loch eine Spur von ziemlich zähem Fischleim, bringt den Rahmen in Alkohol von 50%, und setzt auf jedes Loch eins von den Objekten; diese kleben sofort an und können auf dem Rahmen in Alkohol von 60%, dann von 90% übertragen werden; hier wird die Haut vom Rahmen abgenommen und nach Bedarf in rechtwinklige Streifen zerschnitten, deren Ränder später im Paraffin zum Orientiren dienen.

Hoffmann (Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1899 p. 314) modifizirt die Methode von Patten gründlich dahin, dass er statt des Papieres Glasstreifen nimmt und die Objekte sich mit dem Kollodium-Nelkenöl ganz durchtränken lässt, bevor er sie durch Xylol hindurch auf höchstens 5 Minuten in das Paraffin bringt. Letzteres dient ihm also offenbar nur zur Umkleidung des erstarrten Celloidintropfens, und so schneidet er eigentlich die Objekte in Celloidin, hat übrigens dabei doch Schnittserien von 4 μ erhalten. In besonderen Fällen orientirt er das Objekt in sehr dickflüssigem Kollodium zwischen zwei Deckgläsern und bringt es so in Paraffin, kann aber dann die beiden Gläser erst durch 2 Operationen ablösen.

Auf ähnlichen Prinzipien beruht das Verfahren von Jordan (Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd. 1899 p. 33), das indessen einen eigenen Apparat nöthig macht. Das Mittel zum Einbetten ist hier Kollodium mit Cedernöl.

Nach diesen zum Theil recht komplizirten Methoden berührt den Leser gewiss angenehm die „Méthode d'autoorientation“ von Lécaillon (Recherches sur l'oeuf etc. Thèse Paris 1898 p. 44): die Eier von Chrysomeliden fallen stets mit dem Embryo nach unten; man braucht sie also nur recht langsam im flüssigen Paraffin sinken zu lassen, um über die Lage des Embryos orientirt zu sein.

S. auch unten § 579 über die Orientirung nach Richtebenen und Richtlinien.

143. Einstellung des Messers beim Schneiden. Nicht selten erhält man von ganz sorgfältig eingebetteten Objekten keine guten, d. h. nicht zusammengeschobenen oder verzerrten, zerrissenen, ungleichmässig dicken Schnitte. Dies kann von der unrichtigen Form oder Stärke des Blockes abhangen — s. hierüber § 144 und 147 — aber auch von der falschen Einstellung des Messers. In letzterer Beziehung kommen in Betracht sowohl die Richtung der Schneide (ob rein quer oder schräg zur Bahn) als auch die Elevation des Rückens über der Schneide.

Was zunächst die Richtung der Schneide zur Bahn angeht, so unterliegt es kaum dem Zweifel, dass schwierige Objekte sich mit längsgestelltem Messer eher gut schneiden lassen als mit querem (und mit einem langsam arbeitenden Mikrotom besser als mit einem Schaukelmikrotom oder ähnlichen Instrumenten, wo das Messer äusserst geschwind quer durch das Paraffin fährt). Persönlich habe ich

(Mayer) auch neuerdings wieder die Erfahrung gemacht, dass häufig ein Thier mit starker Muskulatur oder dicker Epidermis, oder ein Darm mit seinen Contentis sich mit quergestelltem Messer nur schlecht, ja selbst gar nicht schneiden lässt, sofort aber ganz leicht und tadellos schneidbar wird, wenn man das Messer längs stellt.

Von neueren Autoren sprechen sich entschieden zu Gunsten des längsgestellten Messers aus Rawitz (Anat. Anzeiger 13. Bd. 1897 p. 65) und Apáthy (Mikrotechnik p. 183); R. unbedingt und A. wenigstens dann, wenn es sich um die Rekonstruktion („Synthese") handelt, wobei ja die Schnitte nicht merklich ver- oder zusammengeschoben sein dürfen. Dagegen schneidet Rabl Embryonen stets mit querem Messer, und Heidenhain betrachtet diese Stellung sogar als selbstverständlich. S. im Uebrigen die ausführliche Behandlung dieser Materie bei Apáthy (Sitzungsb. Med. Nat. Section Siebenbürg. Museumver. 19. Bd. 1897 p. 11; kürzer in: Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 157, ibid. 1898 p. 332).

Ueber die Schneide der Rasirmesser s. auch Mallock (Proc. R. Soc. London Vol. 60 1896 p. 164).

Die Elevation des Rückens über der Schneide (hier ist nur von Schlittenmikrotomen mit horizontaler Messerbahn die Rede) hat man früher vielleicht allzusehr vernachlässigt, wie denn auch erst seit Kurzem Messerhalter mit Einrichtungen zu ausgiebiger und zuverlässiger Aenderung in der Elevation zu haben sind. Gewöhnlich allerdings treffen rein empirisch auch die einfachen Halter in dieser Beziehung so ziemlich das Richtige, d. h. sie verleihen dem Messer eine solche Lage, dass die Unterkante des Rückens um einige Winkelgrade höher verläuft als die Schneide. Verlaufen nämlich diese beiden annähernd in derselben Horizontalen, so schneidet das Messer, da es beim Schleifen auch auf seiner Unterseite eine Facette erhalten hat, nicht ordentlich: entweder es gleitet über das Paraffin hin und drückt es dabei etwas zusammen, oder es liefert einen zu dicken, meist keilförmigen Schnitt. Je weicher nun das Objekt ist, desto stärker muss der Messerrücken gehoben werden; ebenso, je schräger das Messer zur Bahn steht. Macht man aber die Elevation zu stark, so schneidet das Messer schon bald das Objekt nicht mehr regelrecht, sondern kratzt davon Brocken ab. Besonders fatal wird eine falsche Elevation bei genau quergestelltem Messer und harten Objekten, und daher muss man hier beim Ausprobiren ganz sorgfältig zu Werke gehen.

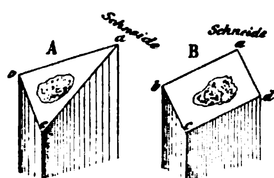
Sind die Messer planconcav geschliffen, so hat man es je nach der Lage der planen Seite im Messerhalter (ob unten oder oben) mit zwei verschiedenen Elevationen zu thun; es zeigt sich in der That,

dass mitunter schon das Umdrehen des Messers genügt, um gute Schnitte zu bekommen, wenn sie bei seiner ursprünglichen Lage nicht zu erhalten waren.

S. auch hierüber die Auseinandersetzung bei APATHY und die kurzen, mehr praktischen Bemerkungen von MAYER & SCHOEBEL (Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd. 1899 p. 29).

An den Mikrotomen mit festem Messer scheinen die obigen Punkte in der Literatur bisher nicht erörtert worden zu sein; sie müssen sich aber analog verhalten, und nur bei den Schaukelmikrotomen werden sie etwas komplizirt sein.

144. Form und Orientirung des Paraffinblocks beim Schneiden. Je nachdem man mit längs- oder mit quergestelltem Messer schneiden will, muss man dem Paraffinblock eine andere Form geben. Im ersten Falle (Fig. A) schneidet man ihn (aus freier Hand) zu einem dreiseitigen Prisma zu und orientirt dieses so, dass das Messer am Eck *a* einschneidet und am Eck *c* austritt; alsdann wird der Schnitt auf der Schneide nur mit dem Punkt *c* haften, kann also leicht mit einer Pincette oder Nadel abgenommen werden. Das Objekt liege nahe der Linie *b c*, damit man zunächst nur Paraffin schneide und, falls es zu rollen Miene macht, es entweder mit dem Schnittstrecker oder mit dem Pinsel etc. flach drücken könne, bevor das Objekt selber geschnitten wird. Im zweiten Falle (B) schneidet man vortheilhafter den Block zu einem rechtwinkligen Prisma zu und orientirt ihn ähnlich wie beim schrägen Messer, also derart, dass die Schneide bei *a* ein-, bei *c* austritt; will man jedoch Bänder schneiden (§ 147), so müssen *a b* und *c d* unter sich genau parallel sein und auch parallel zur Schneide gerichtet werden.



Es ist durchaus nicht immer einerlei, von welcher Seite man das Objekt anschneidet: ist es einigermaassen gross, nicht isodiametrisch und gar von ungleichmässiger Textur, so kann es leicht sein, dass man schlechte Schnitte bekommt, die sich zusammenschieben oder zerreissen, während man gleich darauf, wenn man es anders zum Messer gestellt hat, tadellose Schnitte erhält. Leider lassen sich hierüber keine allgemein gültigen Regeln geben, ausser der, dass man, wenn es in einer Richtung nicht geht, es mit einer anderen oder einer dritten versuchen möge.

145. Schneiden und Strecken der Schnitte. Paraffin wird mit einem trockenen Messer geschnitten, d. h. das Messer wird nicht mit Alkohol, Wasser etc. befeuchtet. So werden die Schnitte zwar besser, rollen sich aber gern auf der Schneide zusammen, und oft so stark, dass sie sich gar nicht wieder strecken lassen. Zur Vermeidung des Rollens ist auf folgende Punkte zu achten.

Vor allem darf das Paraffin nicht zu hart sein, sondern sein Schmelzpunkt muss der Temperatur im Laboratorium entsprechen (Näheres hierüber s. im § 150). Der genaue Grad der Härte muss experimentell festgestellt werden. Zeigt es sich beim Schneiden, dass das Paraffin zu hart ist, so lässt es sich nach Fol (Lehrbuch p. 123) weicher machen: eine Lampe mit einem parabolischen Reflektor wird neben dem Mikrotom so aufgestellt, dass die Wärmestrahlen auf das Objekt fallen; die richtige Temperatur erhält man durch Verschieben der Lampe. (Auch eine Spirituslampe bringt schon mitunter in wenigen Minuten das Paraffin zur richtigen Konsistenz, wärmt allerdings den Block nicht gleichmässig durch.) Ist es dagegen zu weich, so kann man es härter machen, wenn man in das Centrum des Reflektors ein Stück Eis legt. Uebrigens genügt oft schon zur Erzielung der richtigen Härte das Oeffnen oder Schliessen der Fenster, das Anschüren des Feuers im Ofen, das Vorsetzen eines Ofenschirms u. s. w.

Held (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. 1897 p. 345) lässt zum Erwärmen oder Abkühlen des Paraffinblocks und des Messers kaltes oder warmes Wasser in einem dünnen Bleirohr um den Rücken des Messers und in einem Kästchen um das Paraffin zirkuliren. Letzteres mag bei 56° C. schmelzen und liefert doch durch Abkühlung auf 14° C. gute Schnitte bis zu 1 μ, durch Erwärmung auf 26½° solche von 100 μ. — S. auch van Walsem (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 218).

Ferner kann man oft durch Verringern der Dicke der Schnitte das Rollen ganz beseitigen oder wenigstens auf ein unschädliches Maass zurückführen. Endlich schneidet man, wenn es überhaupt angeht, besser Bänder (§ 147) als einzelne Schnitte: oft werden die Bänder ganz flach, während die einzelnen Schnitte sich sofort rollen.

Man hat auch besondere Einbettmassen gegen das Rollen empfohlen, so z. B. ein Gemisch von 4 Theilen Paraffin und 1 Theil Vaselin, indessen vermeidet man diese besser. Dagegen kann man mechanische Mittel anwenden; von diesen ist das einfachste und recht brauchbar folgendes: beim Schneiden hält man die Ecke, die zu rollen anfängt,

mit der Spitze eines feinen Pinsels oder mit einem kleinen Papierstreifen, der an einem Skalpell steckt, auf dem Messer nieder. Man bedient sich zum gleichen Zwocke auch der Schnittstrecker; diese bestehen im Wesentlichen aus einem kleinen Metallcylinder, unter dem der Schnitt mit ganz leichter Reibung hindurch muss und so am Rollen verhindert wird. Wer sich auf einen solchen Apparat eingeübt hat, wird ihn hinterher in den meisten Fällen nicht missen wollen, aber auch der beste ist nicht immer zu brauchen, besonders dann nicht, wenn die Schnitte aus irgend einem Grunde etwas bröckelig sind. Andererseits können die Schnittstrecker namentlich bei stundenlangem Schneiden eine wesentliche Erleichterung gewähren. Jedenfalls sind sie beim Bänderschneiden (§ 147) am wenigsten nöthig.

Literatur über Schnittstrecker: Schulze (Z. Anzeiger 6. Jahrg. 1883 p. 100); Andres, Giesbrecht & Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 4. Bd. 1883 p. 429); Decker (Arch. Mikr. Anat. 23. Bd. 1884 p. 537; ähnlich dem von Mayer); Mayer (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 4. Bd. 1887 p. 40); Francotte (Bull. Soc. Belg. Micr. Tome 10 1883 p. 55; Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 572); Strasser (ibid. 4. Bd. 1887 p. 218; 7. Bd. 1890 p. 291; nur für ganz grosse Schnitte); Klercker (Verh. Biol. Ver. Stockholm 4. Bd. 1892 p. 16; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 254; gar zu primitiv); Born (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 157); Kornauth (ibid. 13. Bd. 1896 p. 160; ähnlich dem von Mayer); am besten von allen diesen verschiedenen sind der von Mayer und der freilich nicht so handliche von Born.

Ein anderes Verfahren besteht darin, die Schnitte sich rollen zu lassen, aber das Rollen zu kontroliren. Zu diesem Zwecke wird der Paraffinblock zu einem Keil zugeschnitten, der etwa 5—6 mal so lang wie breit ist; das Objekt liegt dicht an der Basis des Keils, und die Spitze sieht gegen das Messer. Nun dürfen sich die Schnitte ruhig rollen, denn das Objekt liegt ja am Ende der Rolle, und das wird beinahe flach. Legt man also den Schnitt mit dem breiten Ende auf den Objektträger, so rollt er sich bei gelindem Erwärmen des Glases völlig und liegt flach da.

Wenn sich dagegen die Schnitte zusammenschieben oder wellig werden, so ist entweder das Messer nicht recht scharf oder das Paraffin zu weich; vielleicht wirken sogar beide Ursachen zusammen. Sind die Falten nicht gar zu hoch und enge, so lassen sie sich beim Behandeln der Schnitte mit warmem Wasser wieder glätten (s. § 148), sind also in der Regel nicht gerade schädlich.

Rillen in den Schnitten rühren, wenn sie parallel zur Mittelkante des Mikrotoms, also zur Zugrichtung des Messers verlaufen,

meist von Fehlern an der Schneide her, aber auch wohl davon, dass im Objekte kleine harte Körper liegen, die sich beim Schneiden ablösen und nun vom Messer über die Fläche des Blockes hinweggeführt werden. In extremen Fällen erhält man dann statt eines einheitlichen Schnittes mehrere schmale Streifen; besonders kommt dies beim quergestellten Messer vor. — Ueber die Behandlung geradezu brüchiger Schnitte s. den folgenden §.

146. Behandeln brüchiger Objekte. Manche Objekte sind so brüchig, dass sie trotz aller Vorsicht beim Einbetten und der vorherigen Behandlung beim Schneiden krümeln oder so zerbrechliche Schnitte liefern, dass man sie nicht unverletzt würde auf den Objektträger bringen können. Dies gilt oft von Eiern. Man hilft dem dadurch ab, dass man die obere Fläche des Blockes vor jedem Schnitte ganz dünn mit Kollodium überstreicht, das die Theile auch der zerbrechlichsten Schnitte gut zusammenhält; und wenn man bei nicht besonders zerbrechlichen Objekten ebenso verfährt, so kann man viel dünner schneiden als sonst: Bütschli (Unters. Mikr. Schäume 1892 p. 80) hat auf diese Weise Schnitte von weniger als 1 μ Dicke erzielt.

Mark (Amer. Natural. Vol. 19 1885 p. 628) nimmt ein so schwaches Kollodium, dass es in dünner Schicht auf dem Blocke in 2—3 Sekunden fest wird, ohne zu glänzen, taucht einen feinen Pinsel nur mit der Spitze hinein, streicht ihn am Halse der Flasche ab, so dass er gerade noch feucht ist, und fährt damit über den Block hin (aber ja nicht auch an den Seiten hinab, denn sonst haftet der Schnitt nachher am Messer). Sobald das Kollodium trocken ist, also nach 2—3 Sekunden, schneidet er, zieht das Messer zurück und bestreicht sofort wieder den Block, sodass dieser trocknet, während man den vorigen Schnitt vom Messer nimmt. — Henking (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 478) räth zum Bestreichen eine Lösung von Paraffin in absol. Alkohol an, ferner für äusserst zerbrechliche Objekte (Eier von Phalangiden) eine schwache (hellgelbe) Lösung von Schellack in absolutem Alkohol. — Heider (Embryonalentwickelung von *Hydrophilus* 1889 p. 12; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1892 p. 509) löst Mastix in Aether zu einem Syrup, mischt diesen mit dem gleichen Volumen Kollodium und verdünnt stark mit Aether. — Rabl (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 170) streicht Paraffin, das bei etwa 52° C. schmilzt, aber auf einem Wasserbade weit höher erwärmt worden ist, mit einem Pinsel rasch über die Schnittfläche des Blockes hin und erhält dann zusammenhangende Schnitte, die sich gar nicht oder kaum rollen. — Apáthy (Mikrotechnik p. 123) bedient sich einer 1%igen Lösung von Celloidin.

147. Bandschneiden. Wenn man mehrere Schnitte hintereinander schneidet und sie ruhig auf dem Messer liegen lässt, statt jeden einzeln

wegzunehmen, so haften sie nicht selten mit den Rändern aneinander und bilden so ein Band, das man auf den Objektträger legen kann, ohne dass es zerreisst. Dies erleichtert natürlich das Schneiden einer Serie sehr. Zur Erzielung eines solchen Bandes sind folgende Faktoren nothwendig:

1. muss der Schmelzpunkt des Paraffins in gewisser Beziehung zur Temperatur des Laboratoriums stehen (hierüber s. § 150). 2. muss das Messer quer stehen; 3. muss der Block in einer ganz bestimmten Weise zugeschnitten sein und zur Messerschneide parallel stehen (s. Figur B. auf p. 94); 4. muss man so rasch schneiden wie nur möglich, denn der Druck des Messers erzeugt dann etwas Wärme, und so werden die Ränder des Paraffins etwas weich, so dass die Schnitte aneinanderkleben.

Es ist durchaus nicht nöthig, zur Erzeugung von Bändern sich besonderer Mikrotome zu bedienen, sondern das Jungsche Schlittenmikrotom thut es auch, wenn nur die Messerbahn gut geölt ist. Allerdings sind die automatischen Mikrotome sicherlich hierfür am besten, und unter diesen wieder das Schaukelmikrotom, das von Reinhold-Giltay und das von Minot (s. § 132).

Erfunden wurde das Bandschneiden von CALDWELL (s. Andres, Giesbrecht & Mayer in: Mitth. Z. Stat. Neapel 4. Bd. 1883 p. 430); später ist SPEE (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 7) selbständig auf den nämlichen Gedanken verfallen.

Dagegen ist es in vielen Fällen zweckmässig, den Block in einer ganz bestimmten Weise mit einem Mantel von weichem Paraffin zu umgeben, damit die Schnitte besser aneinander haften. Schon Caldwell hat dies empfohlen. Es ist zwar nicht geradezu nöthig, wenn man in ziemlich weiches Paraffin eingebettet hat, und beim Schneiden die richtige Temperatur im Zimmer herrscht. Aber selbst dann mag es vorkommen, dass dünne Schnitte ohne Weiteres Bänder bilden, dickere hingegen von demselben Blocke es nicht mehr thun. Und wenn man gar die Objekte in Paraffin von 55—60° Schmelzpunkt einbettet, so ist es für Schnitte von 10 µ absolut nöthig und für dünnere wenigstens rathsam, den Mantel von weichem Paraffin (etwa 40° Schmelzp.) um den Block zu legen. Dies macht man am besten so: ist der Block zugeschnitten, wie in Fig. B auf p. 94, so taucht man ihn in das weiche Paraffin, das man in einem Wasserbade auf etwa 80° erhitzt hat, einen Augenblick ein, dreht ihn sofort um, damit das flüssige Paraffin sich möglichst an die Basis des Blockes ziehe, lässt ihn wieder erkalten und schneidet nun an den Flächen

bc und *ad*, nicht aber auch an *ab* und *cd*, das weiche Paraffin weg. Bei grossen Objekten mag man den Mantel durch zweimaliges Eintauchen stärker machen. Jedenfalls muss man den Block aber in das Mikrotom genau so wie vorher einsetzen, d. h. mit den Kanten *ab* und *cd* parallel zur Messerschneide; am Jungschen Schaukelmikrotom wird dies durch eine eigene Vorrichtung auf sehr einfache Art erreicht.

Objekte von ungleicher Textur oder erheblicher Grösse schneiden sich in Bändern viel schlechter als mit längsgestelltem Messer; besonders gilt dies von Geweben mit Chitin oder viel Muskulatur. Bänder zu schneiden empfiehlt sich also nur dann, wenn lange aber schmale Thiere, z. B. Würmer oder Embryonen etc., in Querschnitte zerlegt werden sollen, oder wenn man sich rasch über den Bau eines Organs oder Thieres orientiren will, endlich für Kurse, wo viele Schnitte zur Vertheilung an die Praktikanten in kurzer Zeit angefertigt werden müssen. So absolut sicher, wie man mit dem längsgestellten Messer in ruhigem Tempo einen Schnitt nach dem anderen erhalten kann, arbeitet man nach der Bandmethode wohl nie.

Zum genauen Zuschneiden des Blockes sind verschiedene kleine Apparate empfohlen worden, so vor Kurzem noch ein sehr komplizirter von ETERNOD (Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1899 p. 421) und ein relativ einfacher von SCHAFFER (ibid. 16. Bd. 1900 p. 417). Beide beruhen auf dem Prinzipe des Fallbeiles. Das Mikrotom selber verwendet dagegen KASTSCHENKO (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. 1866 p. 389); s. auch § 579. In der Regel wird man jedoch aller dieser Vorkehrungen nicht bedürfen, sondern sich auf dem Block die nöthigen Linien mit einer Nadel vorzeichnen und danach mit einem scharfen Messer behutsam das überstehende Paraffin abtragen.

Es kommt vor, allerdings selten, dass das Schnittband beim Schneiden elektrisch wird und nun in der Luft allerlei Kurven beschreibt, sich auch in unerwünschter Art an feste Gegenstände anschmiegt. Durch leichtes Erwärmen wird es wieder flach, aber bisher kennt man kein Mittel, um das Auftreten dieser elektrischen Spannung zu verhüten.

148. Glätten der Schnitte. Wenn sich die Schnitte beim Schneiden gefaltet oder zusammengeschoben haben, so glättet man sie wohl am besten, indem man sie auf warmes Wasser (in einem Uhrglase oder sonst einem tauglichen Gefäss) bringt, sie hier schwimmen lässt, wobei sie glatt werden, und dann auf den Objektträger überträgt. Oder — und dies ist besonders anzurathen, wenn es sich um einzelne Schnitte, nicht um Bänder handelt — indem man den Objektträger benetzt, die Schnitte darauflegt und nun den Objektträger auf etwa 45—50 ° C. erwärmt, bis die Schnitte sich strecken, was in wenigen

Sekunden geschieht. Letztere Methode kann gleichzeitig zum Aufkleben der Schnitte dienen. Genaueres s. in § 184 und 186.

van Walsem (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 228) ordnet die Schnitte auf einem Streifen Pergamentpapier an, das dann befeuchtet und über eine geheizte Walze geführt wird, die sich in einem Gefässe mit Wasser dreht.

149. Einschliessen der Schnitte. Sind die Schnitte geglättet und (falls man sie nicht etwa lose behalten will) auch gut auf dem Objektträger befestigt (§ 183 ff.) so braucht man nur noch das Paraffin zu entfernen und kann sie dann entweder direkt oder erst nach der Färbung in Harz (Balsam, Dammar etc.) oder wässerige Flüssigkeiten (Glycerin etc.) einschliessen. Als Lösemittel des Paraffins sind empfohlen worden: Terpentinöl kalt oder warm, ein Gemisch von 4 Theilen Terpentinöl mit 1 Theil Kreosot, Kreosot allein, Terpentinöl mit Nelkenöl, ferner Benzol, Toluol, Xylol, eine schwache Lösung von Kanadabalsam in Xylol (nur für sehr dünne Schnitte), heisser absoluter Alkohol, Chloroform, Erdöl (Naphtha) oder ein anderes Steinöl von niederem Schmelzpunkt. Brauchbar sind diese alle, aber am besten sind doch wohl Xylol und Toluol. (Chloroform und Benzol sind arg flüchtig, und man muss daher schon recht geschickt verfahren, wenn man Harz und Deckglas auf die Schnitte bringen will, bevor diese ganz oder zum Theil trocken geworden sind. Abgesehen hiervon sind beide Mittel aber sehr brauchbar.)

Hat man die Schnitte auf dem Objektträger bis zum Schmelzen des Paraffins erwärmt, so löst sich dieses, wenn man den Objektträger in ein Glas mit Xylol oder Toluol bringt, natürlich viel rascher als sonst. Will man sie dann in Harz einschliessen, so kann dies sofort geschehen, will man sie färben, so wandert der Objektträger zunächst in ein Glas voll Alkohol, um das Xylol etc. zu entfernen, und von da entweder direkt in das Färbbad, falls es stark alkoholisch ist, oder erst in schwächeren Alkohol und eventuell von da noch in Wasser, falls es wässerig ist. Später macht er den umgekehrten Weg durch (Alkohol, Intermedium, Harz), wenn man nicht etwa die Schnitte unter Glycerin oder anderen wässerigen Flüssigkeiten aufheben will.

Für lose Schnitte gelten dieselben Regeln, aber bei den grossen Schwierigkeiten, die mit ihrer Behandlung verknüpft sind, wird man nur in ganz seltenen Fällen damit zu thun haben. — Eine recht komplizirte Methode zur Behandlung solcher Schnitte beschreibt van Walsem (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1897 p. 428).

150. Einbettmassen für das Schneiden in Paraffin. Gegenwärtig ist man fast allgemein der Ansicht, dass **reines Paraffin** für die ge-

wöhnlichen Arbeiten eine Einbettmasse liefert, die den zahlreichen früher empfohlenen Gemischen von Wachs mit Oel u. s. w. weit überlegen ist; auf diese soll daher gar nicht weiter eingegangen werden.

Ganz vor Kurzem noch hat VAN WALSEM (Verh. Akad. Amsterdam (2) 7. Deel 1899 Nr. 1 p. 132) für Schnitte durch das Centralnervensystem Paraffin (von 52—57° Schmelzp.) mit 5% gelbem Wachs empfohlen. Es mag ja sein, dass in solchen extremen Fällen der Zusatz einer zäheren Masse rathsam ist, indessen liegen darüber noch zu wenige Erfahrungen vor.

Im Handel gibt es reine Paraffine von verschiedenen Schmelzpunkten (40—42, 46—48, 52—54, 56—58, 58—60, 60—62° C.), und die Sorten dazwischen lassen sich durch Zusammenschmelzen herstellen. In der Regel wird man mit zwei Sorten, einer für dicke, einer für sehr dünne Schnitte, auskommen. — Das ganz harte Paraffin von 74—80° C., wie es z. B. im Deutschen Arzneibuche vorgeschrieben ist, eignet sich nach meiner (MAYER) Erfahrung nicht.

Wie hart nun das Paraffin genommen werden soll, das hängt sowohl von der Temperatur im Laboratorium ab als auch von der Art des Objektes und der Dicke der Schnitte, die man haben will, und es lassen sich darüber nur einige ganz allgemeine Sätze formuliren. So gibt (nach LEE) ein Paraffin von 50° C. Schmelzpunkt die besten Resultate, so lange die Temperatur im Laboratorium zwischen 15 und 17° C. bleibt, während bei grösserer Wärme ein härteres erforderlich ist. Die meisten Forscher verwenden Massen von 50 bis 55° C. und manche gehen sogar bis 60° C. oder höher. Dies thun z. B. Heidenhain (58°), Apáthy (55°), Rabl (56°), Mayer (58—60°); und alle nehmen wohl, auch ohne dies ausdrücklich zu sagen, ein um so härteres Paraffin, je dünner die Schnitte werden sollen. In Neapel, überhaupt in wärmeren Klimaten, wo man im Sommer oft genug bei 30° C. schneiden muss, sind dann eben nur die ganz harten Paraffine (60° C.) zu gebrauchen, und selbst diese versagen mitunter bei recht feinen Schnitten. Nur soll man da, wo man mit einem weicheren Paraffin auskommen kann, nicht unnöthig härteres nehmen, wie ich (MAYER) denn auch selber im Winter eins von etwa 56° oder noch weniger verwende.

STRASSER (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 7) braucht Paraffin von höchstens 40°, aber nur für seine Riesenschnitte von 10×15 cm Fläche. — MICHEL (C. R. Soc. Biol. Paris (10) Tome 4 1897 p. 549) durchtränkt die Gewebe mit Paraffin von 45° Schmelzpunkt und bettet sie in solches von 55° ein.

Zum Schneiden mit dem Quermesser, besonders bei den Schaukelmikrotomen und ähnlichen rasch arbeitenden Maschinen, wird man stets härteres Paraffin brauchen als ceteris paribus mit längsgestelltem Messer auf einem Schlittenmikrotom. Ebenso erfordern harte Objekte ein härteres Paraffin als weiche.

Alle obigen Zahlen beziehen sich natürlich nur auf die Schneidfähigkeit des Paraffinblocks und des Objektes darin. Ob nun nicht bei der Verwendung sehr harten Paraffins, wie sie ja oft unumgänglich ist, die Gewebe leiden, das ist eine Frage für sich, über deren Beantwortung die Forscher keineswegs einig sind. Nur so viel gilt ohne Zweifel für alle feineren Arbeiten, dass man im Interesse der guten Erhaltung der Gewebe ein möglichst leicht schmelzbares Paraffin nehmen soll.

Brass (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 300) gebraucht Paraffin, das schon mehrere Jahre gelegen hat, da es weniger leicht kristallinisch werde als neues.

Spee (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 8) empfiehlt als besonders günstig für Schnittbänder **überhitztes Paraffin.** Er kocht Paraffin, das bei etwa 50° C. schmilzt, in einer Porzellanschale auf einer kleinen Flamme. Nach 1—6 Stunden (je nach der Menge) stösst es übelriechende weisse Dämpfe aus, nimmt ein wenig an Volum ab, wird bräunlichgelb und sieht nach dem Erkalten auf dem Schnitt fettig oder seifig aus. Zugleich ist der Schmelzpunkt um einige Grade gestiegen. Die Masse ist übrigens bei Grübler & Hollborn käuflich zu haben.

B. Seifen.

151. Nutzen der Seifen. Die Seifen haben als Einbettmassen ohne Zweifel manche guten Eigenschaften. Sie lösen sich in Alkohol, sind sehr durchsichtig, dringen gut ein und sollen sich, wenn sie gut sind, viel besser als selbst Paraffin schneiden. Man schneidet sie trocken oder unter Alkohol. Was die Erhaltung der Gewebe in ihnen angeht, so sind sie alkalisch, und das spricht gegen sie; indessen ziehen einige Forscher sie dem Paraffin immer noch vor, und sie sind denn auch von Chun für so zarte Objekte wie die Siphonophoren deswegen empfohlen worden, weil diese in ihnen weniger schrumpfen sollen als in Paraffin. Sicher können Seifen dann von Nutzen sein, wenn die Objekte die völlige Entwässerung nicht vertragen, ohne zu schrumpfen.

Nach Pölzam (s. Salensky in: Morph. Jahrb. 3. Bd. 1887 p. 558) wird Kernseife in dünne Scheiben geschnitten, an der Sonne liegen gelassen, bis sie trocken ist, pulverisirt und mit Alkohol zu einem Brei angemacht. Dieser wird mit so viel Alkohol und Glycerin gemischt, dass auf je 10 Gewichtstheile Seife 22 Glycerin und 35 Alkohol (von 90%) kommen. Das Gemisch wird gelinde

gekocht, bis es ein durchsichtiger Syrup geworden ist. Die vorher entwässerten Objekte werden darin wie in Paraffin eingebettet. Aus den Schnitten wird die Seife mit Wasser oder schwachem Alkohol entfernt.

Nach Kadyi (Z. Anzeiger 2. Jahrg. 1879 p. 477) werden 25 g Stearin-Natronseife (am besten weisse Wachskernseife) geschabt, mit 100 ccm Alkohol von 96% auf dem Wasserbade bis zur Lösung erwärmt und, falls es nöthig ist, filtrirt. Lässt man nun einen Tropfen hiervon in ein Uhrglas fallen, so erstarrt er fast sofort zu einer weissen Masse; dies ist ein Zeichen davon, dass die Masse noch zu wenig Wasser enthält. Man setzt daher nach und nach etwas Wasser hinzu und probirt jedesmal einen Tropfen, bis dieser fast ganz durchsichtig geworden ist. (Zu der obigen Menge sind meist nur 5—10 g Wasser erforderlich.) Nimmt man zu viel Wasser, so erstarrt die Seife zu langsam oder gar nicht mehr.

Die Kadyische Masse kocht bei 60—70° C. Zum Einbetten nimmt man ein Papierkästchen oder ein Uhrglas. Beim Schneiden befeuchtet man Block und Messer mit starkem Alkohol; die Schnitte kommen in Alkohol von 96%, der die Seife sehr bald, in der Wärme augenblicklich, auszieht. — S. auch Flemming (Arch. Mikr. Anat. 9. Bd. 1873 p. 121) und über die Einbettung in selbstbereitete Natronseife Döllken (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 33).

C. Gelatine-Massen.

152. Einbetten in Gelatine. Diese lässt sich mit Vortheil bei Geweben anwenden, die man gar nicht entwässern darf oder will, und mag deswegen gute Dienste bei sehr wasserhaltigen Objekten leisten. Im Ganzen verfährt man dabei wie bei den bisher erwähnten Massen, nur müssen hier die Objekte mit Wasser durchtränkt werden statt mit Alkohol und einem Intermedium. Ist die Masse kalt geworden, so ist sie zuweilen direkt schneidbar, gewöhnlich muss sie aber erst noch gehärtet werden, und zwar entweder, indem man sie einige Minuten mit absolutem (Kaiser) oder einige Tage mit schwächerem (Klebs) Alkohol oder mit Chromsäure (Klebs) oder mit Formol (Nicolas) behandelt oder endlich gefrieren lässt (Sollas). Aus den Schnitten schafft man sie mit heissem Wasser fort, wenn sie nicht etwa inzwischen unlöslich geworden ist.

Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 27) härtet zu gröberen Untersuchungen nach dem Einbetten des Objekts die Gelatine in Alkohol von 80%, benetzt auch beim Schneiden das Messer mit demselben Alkohol und belässt die Gelatine um die Schnitte, da sie in Balsam durchsichtig genug wird (vorausgesetzt, dass das Objekt in toto gefärbt worden ist). Als Unterlage, worauf der Block mit dem Objekt darin mit warmer Gelatine aufgekittet wird, empfiehlt er sein künstliches Hollundermark: die in Wasser gequollene Gelatine wird mit $^1/_4$—$^1/_2$ ihres Volumens an Rizinusöl tüchtig durchgeschüttelt und dicht vor dem Erkalten in eine Schale ausgegossen; wird dann durch 90%igen

Alkohol das Oel ausgezogen, so bleibt die Gelatine als sehr feinporige, nicht elastische Masse zurück.

In eine Lösung von Agar-Agar, die bei 35—37° C. flüssig ist, bettet BIONDI (Arch. Mikr. Anat. 31. Bd. 1887 p. 108) Blut ein, härtet die kaltgewordene Masse mit Alkohol von 85° und schneidet sie direkt oder bringt sie erst noch durch Bergamottöl in Paraffin, um ganz feine Schnitte zu erhalten.

153. Glyceringelatine. KLEBS (Arch. Mikr. Anat. 5. Bd. 1869 p. 165) mischt konzentrirte Lösung von Hausenblase mit dem halben Volumen Glycerin.

APÁTHY (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1897 p. 718) bringt die Objekte aus Wasser in eine dünne Glyceringelatine, lässt aus dieser in einem Exsiccator bei der zum Flüssighalten gerade erforderlichen Temperatur das Wasser verdunsten, giesst die Masse in Metallrahmen (oben p. 81) aus und härtet sie in absol. Alkohol, schneidet sie auch unter diesem.

154. Gelatine nach Kaiser (*Bot. Centralbl. 1. Jahrg. 1880 p. 25). Ein Gewichtstheil feinste Gelatine wird etwa zwei Stunden lang in 6 Theilen Wasser eingeweicht, dann mit 7 Theilen Glycerin vermischt; auf je 100 g des Gemisches wird 1 g Karbolsäure zugesetzt. Dann erwärmt man unter Umrühren 10—15 Minuten lang, bis alle Schlieren, die von der Karbolsäure herrühren, vergangen sind. Man filtrirt die warme Lösung durch feinste Glaswolle, die vorher in Wasser gewaschen und nass in den Trichter gelegt wird.

155. Gelatine nach Gerlach für ganze Embryonen u. s. w., nicht für Schnitte (Beitr. Morphol. Morphogen. 1. Bd. Stuttgart 1884 p. 118): Gelatine 40 g, konzentrirte Lösung von arseniger Säure 200 ccm, Glycerin 120 ccm. Mit Eiweiss zu klären. Die Masse hält sich in gut verschlossenen Flaschen Jahre lang. Die in Alkohol gehärteten Objekte werden vorher mit verdünntem Glycerin (1 Theil Glyc. und 2 Theile Wasser) so lange durchtränkt, bis aller Alkohol entfernt ist.

156. Gelatine nach Nicolas (Bibliogr. Anat. Paris 3. Année 1896 p. 274; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 218). Die in Müllers Gemisch konservirten und sorgfältig unter der Wasserleitung ausgewaschenen Objekte (Gehirne und Stücke des Rückenmarks von kleineren Hunden und Katzen, Augen von Schweinen, 3—4 cm grosse Embryonen von Schafen) werden in warme Gelatine eingebettet: zuerst bei 25° C. in eine sehr dünne (3—5 %), nach je 1 Tag bei 35° in 10 %ige und in 20—25 %ige, die mit 8—10 % Glycerin versetzt ist; in letzterer bleiben sie 2—3 Tage, werden dann in Papierkapseln ausgegossen und,

sowie die Gelatine nicht mehr flüssig ist, in eine 5 %ige Lösung von Formaldehyd (also Formol 1, Wasser 7 Theile) gebracht. Hierin wird die Gelatine nach einigen Tagen schneidfähig wie Celloidin und zugleich unlöslich, kann auch Monate lang unverändert in Wasser aufbewahrt werden. Beim Färben der Schnitte nimmt aber die Gelatine die Farbe mit auf und hält sie hartnäckig fest. Auch werfen sich die Schnitte beim Uebertragen in die stärkeren Alkohole leicht, lassen sich aber in „Cresylol“ wieder glätten und dann direkt in Balsam bringen. Der Einschluss in Glycerin ist natürlich ganz einfach.

---

8. Kapitel.

Einbetten in Kollodium (Celloidin) und andere kalte Massen.

A. Kollodium (Celloidin).

157. Vor- und Nachtheile des Kollodiums oder Celloidins. Beide Substanzen erfordern keine Wärme — das kann bei manchen zarten Geweben wichtig werden — und sind durchsichtig, erleichtern daher die Orientirung. Besonders gut sind sie für sehr grosse Objekte, denn das Durchtränken mit Kollodium ist meist ganz unschädlich und darf daher nöthigenfalls Wochen lang dauern. Endlich aber braucht die Masse als durchsichtig in der Regel aus den Schnitten vor dem Färben und Einschliessen nicht entfernt zu werden, schützt vielmehr die Gewebe hierbei auf das Beste und hält brüchige oder isolirte Theile der Schnitte zusammen, die sonst auseinanderfallen und verloren gehen würden.

Indessen zwei Nachtheile sind doch vorhanden: 1) ist das Einbetten in Kollodium oder Celloidin recht umständlich und dauert auch sehr lange; gewöhnlich gehen drei Tage damit hin, wo für Paraffin eine Stunde genügen würde (über die rasche Methode von Gilson s. 166); 2) lassen sich nicht so dünne Schnitte machen wie mit Paraffin; uns sind in Serien nur noch solche von 7 μ geglückt, und die sind bei vielen Arbeiten doch zu dick. S. im übrigen oben § 136.

Apáthy (Mikrotechnik p. 122) versichert allerdings, durch Celloidin und gewisse Objekte darin Serien von 2—3 μ dicken Schnitten ausgeführt zu haben, gibt indessen leider sein Verfahren nicht an. Gage (Trans. Amer. Micr. Soc. Vol. 17 1896 p. 365) macht von Objekten, die nicht über 5 mm breit und lang sind, Schnitte von 5—6 μ. Aehnlich Mitrophanow (Arch. Z. Expér. (3) Tome 3 1896 p. 617). S. ferner oben § 142 die Angaben von Hoffmann und unten § 170 die von Jordan.

158. Kollodium, Celloidin und Photoxylin. Das Kollodium, eine Auflösung von Schiessbaumwolle (Pyroxylin) in Alkohol plus Aether, hat zum Einbetten zuerst DUVAL (Journ. Anat. Phys. Paris 15. Année 1879 p. 185) verwandt. Das Celloidin, das von (Merkel und) SCHIEFFERDECKER empfohlen wurde (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1882 p. 199) ist nur eine besonders reine Schiessbaumwolle, die nach einem eigenen Verfahren hergestellt wird. Man erhält es entweder direkt von R. Schering in Berlin oder von Grübler & Hollborn oder anderen Handlungen, und zwar in Tafeln von zäher Konsistenz und etwas milchigem Aussehen. Stücke von einer solchen Tafel — sie wiegt etwa 200 g und soll 40 g trocknes Celloidin enthalten — löst man in Aether plus Alkohol zu einem Kollodium von beliebiger Dicke auf, besser jedoch schabt man sie nach APÁTHY (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 164) in dünne Späne, trocknet diese an der Luft, bis sie gelb, durchsichtig und hornig geworden sind, und löst sie erst dann auf. So bekommt man die Lösungen frei von dem Wasser, das im ungetrockneten Celloidin vorhanden ist, und in Folge davon nach dem Härten eine Masse, die durchsichtiger ist und sich auch besser schneidet.

Es versteht sich von selbst, dass sowohl der Alkohol als auch der Aether möglichst wasserfrei und nicht sauer sein müssen. Leider lösen sich die Späne von trocknem Celloidin nur sehr langsam. ELSCHNIG (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 443) lässt sie daher zuvor 24 Stunden bloss in der nöthigen Menge Alkohols aufquellen und setzt dann den Aether zu; alsdann lösen sie sich viel rascher.

Zwar ist gewöhnliches Kollodium ebenfalls gut zum Einbetten, aber Celloidin ist angenehmer im Gebrauch und liefert auch bequemer Lösungen von bestimmter Stärke. Abgesehen hiervon sind beide Stoffe ziemlich gleich, und so werden denn auch in diesem Buche die Ausdrücke Celloidin und Kollodium ohne Unterschied gebraucht. Ueber die Verwendung der Schiessbaumwolle s. § 160.

Photoxylin (KRYSINSKY in: Arch. Path. Anat. 108. Bd. 1887 p. 217; BUSSE in: Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 47; MITROPHANOW in: Arch. Z. Expér. (3) Tome 3 1896 p. 617) ist trocken, sieht wie Baumwolle aus und steht chemisch dem Celloidin nahe. Man erhält es von Schering oder Grübler & Hollborn. In einem Gemisch gleicher Theile von absol. Alkohol und Aether löst es sich klar und wird genau wie Celloidin gebraucht. Sein Vortheil besteht darin, dass es auch nach dem Härten in 85%igem Alkohol völlig durchsichtig bleibt. Indessen Celloidin oder gewöhnliches Kollodium geben auch ganz durchsichtige Massen, wenn man die Blöcke aufhellt (s. § 165); nach dieser Richtung hin gewährt es also keinerlei Vortheil, falls man nicht etwa nach der alten Methode verfahren will. Auch APÁTHY (Mikrotechnik p. 120) hält die Einführung des Photoxylins für keinen Fortschritt, OBREGIA dagegen (Neur. Centralbl. 9. Jahrg. 1890 p. 295) lässt es für Schnittserien vortheilhafter sein.

159. Vorbereitung der Objekte. Die Objekte müssen zunächst sehr sorgfältig in absolutem Alkohol entwässert werden und kommen dann zu ebenfalls völliger Durchtränkung in Aether oder besser in ein Gemisch von Alkohol und Aether. Duval (l. c.) nimmt auf 10 Theile Aether 1 Theil Alkohol; Schiefferdecker (und die meisten Forscher) gleiche Theile; Tubby (Nature Vol. 47 1892 p. 51) 4 Theile Aether und 1 Theil Alkohol. Indessen kommt hierauf nicht viel an. Ueberhaupt darf man kleine Objekte, wenn sie leicht permeabel sind, auch direkt vom Alkohol in das Celloidinbad bringen. — Ueber die Verwendung von Aceton s. § 160 (Fish).

160. Das Celloidinbad. Jetzt müssen die Objekte zunächst mit Kollodium durchtränkt werden, und hierzu kommen sie in eine dünne Lösung, später erst in eine dickere.

Nimmt man Kollodium, so vermischt man es, um die dünne Lösung herzustellen, mit Aether, verwendet man Celloidin oder Photoxylin, so löst man es in einer Mischung von Alkohol und Aether zu gleichen Theilen auf. (S. hierüber oben § 158.)

Busse (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 47) giebt folgende Vorschriften für die Bäder: für das schwächste 10 Gewichtstheile Photoxylin oder ganz trocknes Celloidin auf 150 Theile Alkohol und Aether; für das mittelstarke 10 auf 105, und für das ganz starke 10 auf 80 Theile (zum schwächsten Bad kann man auch ein schon gebrauchtes nehmen).

Gage (Trans. Amer. Micr. Soc. Vol. 17 1896 p. 362) braucht statt des Celloidins die billigere Schiessbaumwolle in einer schwachen und einer starken Lösung: Aether und 95%iger Alkohol je 50 ccm, Schiessbaumwolle 1½ resp. 6 g.

Apáthy (Behrens, Tabellen 3. Aufl. 1898 p. 82) kennt 3 Lösungen: eine 2%ige und 4%ige zum Durchtränken und eine 8%ige zum definitiven Einbetten.

Ich (Lee) verwende gewöhnlich zwei Lösungen: eine schwache und eine starke, letztere entspricht etwa der mittelstarken von Busse, denn seine ganz starke ist so dick, das sie die Objekte nur äusserst langsam durchdringt. — Mir (Mayer) will es scheinen, als wenn selbst die 4%ige lange nicht überall eindringt, und ich halte es daher für geboten, mit einer noch schwächeren zu beginnen. (S. auch unten Jordan.)

Fish (Journ. Appl. Micr. Vol. 2 1899 p. 323) braucht als Intermedium (ja sogar zum Fixiren und Entwässern des Objektes!) und zur Bereitung der Bäder (einer 4%igen und einer 8%igen Lösung von Pyroxylin) nur Aceton.

Stepanow (Zeit. Wiss. Mikr. 17. Bd. 1900 p. 185) löst 1½ g trocknes Celloidin in einem Gemisch von 5 ccm Nelkenöl (oder Eugenol) und 20 ccm Aether, dem er tropfenweise absol. Alkohol (bis zu 1 ccm) zusetzt. In dieses Bad kommt das Objekt direkt aus dem absol. Alkohol, und man lässt nach guter Durchtränkung das Ganze sich langsam eindicken.

JORDAN (ibid. p. 193) verwendet für die Bäder ebenfalls Celloidin mit einem ätherischen Oel: auf 1 Theil Cedernöl kommen für das schwache 4 Theile 1%ige, für das starke 5 Theile 8%ige gewöhnliche Celloidinlösung.

UNNA (Monatsh. Prakt. Derm. 30. Bd. 1900 p. 422) empfiehlt sein Celloidinum inelasticum, d. h. ein von Schering zu beziehendes relativ unelastisches Celloidin, das aus gewöhnlichem C. mit 2% Rizinusöl (oder Terpentinöl oder stearinsaurem Natrium) besteht.

Im 1. Bade muss das Objekt so lange bleiben, bis es ganz sorgfältig durchtränkt ist; das kostet sogar für kleine Objekte Tage, und für grosse (z. B. menschliche Embryonen von 6—12 Wochen) Wochen oder Monate. Enthält es Hohlräume, so öffne man diese, damit sie ja sicher gefüllt werden. Ist es nun in der dünnen (oder in den dünnen, wenn man mehr als eine braucht) Lösung gut durchtränkt, so wandert es in die dickere.

161. Einbetten. Die stärkste Lösung von Celloidin (oder Pyroxylin etc.) wird, da sie ihrer Dicklichkeit wegen nicht in die Objekte eindringt, nur zum Einbetten benutzt. Als Gefässe dazu kann man Papierkapseln oder Papierkästchen — über ihre Anfertigung s. oben p. 81 — nehmen, viel besser aber sind dazu Glasschalen mit flachem Boden; auch eignen sich für kleine Objekte wohl Uhrgläser. Alle müssen aber ganz trocken sein. In die Gefässe nun bringt man vorsichtig, indem man sich besonders vor dem Auftreten von Luftblasen im Celloidin in Acht nimmt, die Lösung und die Objekte. Bilden sich dabei doch Luftblasen, so muss man sie vor dem Härten entfernen, etwa indem man das Ganze in einem Exsiccator oder sonst gut schliessenden Gefässe 1 oder 2 Stunden lang Dämpfen von Aether aussetzt. Jedoch darf der Aether, den man auf den Boden des Gefässes giesst, die Masse nicht benetzen (BUSSE in: Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1892 p. 467).

In der Regel wird eine besondere Orientirung nicht nöthig werden, da ja das durchsichtige Celloidin das Objekt meist genau erkennen lässt. Ist sie aber aus irgend einem Grunde erwünscht, so mag man sich an die Methoden von Apáthy oder Halle & Born halten.

APÁTHY (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 47) ordnet die Objekte auf einem kleinen rechtwinkligen Streifen Gelatine, der zu unterst in das Einbettgefäss gelegt wird. Die Gelatine wird später mitgeschnitten, und ihre Kanten bilden gute Linien zur Orientirung. — HALLE & BORN (Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1896 p. 364) benutzen Täfelchen von gehärtetem Eiweiss, worin sie zur Aufnahme der Objekte mit einem eigenen Instrument eine schmale Furche geschnitten haben.

S. auch die komplizirte Methode von EYCLESHYMER (Amer. Natural. Vol. 26 1892 p. 354: sie ist genauer in der 1. Aufl. dieses Buches p. 99 angegeben).

Verwendet man runde **Papierkapseln**, so darf ihr Boden nicht aus Kork bestehen, denn dieser würde in der Objektklammer nachgeben und die Masse sammt dem Objekt deformiren. Man nehme also statt dessen weiches Holz und bringe gleich einen Tropfen Kollodium darauf, den man trocknen lässt; so verhindert man später das Aufsteigen von Luftblasen aus dem Holz in das Kollodium. — Zur Noth kann man die Objekte auch auf Leder, Hollundermark, Kork oder Holz befestigen, die aber vorher ebenfalls mit einer Schicht trocknen Kollodiums versehen worden sind.

Statt hintereinander 2 oder 3 Lösungen von zunehmender Stärke zu brauchen, kann man auch mit Lee (Vade-Mecum 1. Edit. 1885 p. 194) und Anderen die erste, dünne langsam eindicken, etwa indem man unter den Deckel des Gefässes ein Stück Papier schiebt, und sie in dem Maasse, wie sie verdunstet, durch dicke ersetzt. — Wolff (Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd. 1900 p. 427) rühmt sogar dies Verfahren sehr, da man so die Härte des Celloidins der des Objektes anpassen könne. Nur muss man den Aether und Alkohol **sehr** langsam verdunsten und die Luft nicht direkt zutreten lassen. S. auch den folgenden § und § 160 (Stepanow).

162. Vorläufiges Härten. Sind die Objekte ordentlich in der dicken Lösung untergebracht (§ 161), so werden die Gefässe oder Kästchen etc. unter eine Glasglocke gesetzt, die der Luft gerade so viel Zutritt gönnt, dass der Aether und Alkohol langsam verdunsten können. Oder man legt auf die kleinen Porzellanschalen etc. einen nicht dicht schliessenden Deckel.

Sobald nun das dicke Kollodium (man darf nur so viel genommen haben, dass das Objekt eben bedeckt war) so weit verdunstet ist, dass das Objekt gerade herausschaut, fügt man etwas dicke Lösung zu und überlässt von Neuem das Ganze sich selbst. (Sollte die erste Schicht zu trocken geworden sein, so muss man sie mit einem Tropfen Aether anfeuchten, bevor man das Kollodium hinzugiesst.) Jedenfalls muss man auch jetzt wieder die Verdunstung langsam vor sich gehen lassen, entweder wie oben angegeben, oder vielleicht besser so, dass man die Objekte unter eine **hermetisch** schliessende Glocke bringt, die man nur 1 oder 2 mal täglich einige Sekunden lang abnimmt. (Auch lässt sich unter diese Glocke neben die Objekte eine Schale mit Alkohol setzen, sodass der Aether durch eine Atmosphäre von Alkohol hindurch verdunstet; so besonders bei sehr grossen Objekten.) Der ganze Prozess aber wird, falls nöthig, 2 oder 3 Tage lang von Zeit zu Zeit wiederholt.

Ist die Masse so fest geworden, dass der Ballen (**nicht** der Nagel) des Fingers keinen Eindruck mehr hinein macht, so sticht man sie aus der Schale oder Form heraus (oder, falls sie in Papier war,

löst man dieses ab) und härtet sie definitiv (§ 163). Sollte sie aber noch nicht hart genug sein, um sich ohne Schaden herausnehmen zu lassen, so legt man sie auf 1 bis 2 Tage in schwachen Alkohol (von 30—70 %).

163. Definitives Härten. Von den Methoden zur definitiven Härtung möchte ich (Lee) für kleine Objekte die von Viallanes (Ann. Sc. N. (6) Tome 14 1883 p. 129) mit Chloroform empfehlen, da sie rascher wirkt als die mit Alkohol und die Masse wenigstens ebenso gut härtet. (Schieffferdecker in: Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1881 p. 506 findet das nicht.) Für grosse Objekte dagegen mag sie der Alkoholmethode nachstehen, da die rasche Härtung der äusseren Schichten die Diffusion zu den inneren verhindert.

Das Chloroform muss wasserfrei sein. Man bringt die vorläufig gehärteten Celloidinblöcke mit den Objekten hinein, und nun gesteht das Celloidin zur Konsistenz von Wachs, wird elastisch und ganz durchsichtig. Mitunter genügen hierzu einige Stunden; meine Objekte haben nie mehr als 3 Tage gebraucht, aber die Länge der Zeit variirt so ganz unberechenbar, dass sich keine Regel geben lässt. Das Celloidin wird oft, wenn es in das Chloroform kommt, undurchsichtig, erlangt aber später seine Transparenz wieder.

Kleine Objekte kann man direkt in Chloroform härten, ohne sie vorgehärtet zu haben. Man braucht nur die dickliche Masse einige Sekunden an die Luft zu stellen, bis sich eine Haut darüber gebildet hat, und darf sie dann gleich in das Chloroform bringen.

Gut härtet man auch in Chloroform-Dampf. Man bringt die noch flüssige Masse (über die Entfernung der Luftblasen s. § 161) in ihrem Gefäss in einen Exsiccator, der auf dem Boden einige Tropfen Chloroform enthält. Dies wirkt sehr rasch, und die Masse wird schliesslich mindestens ebenso hart wie mit Alkohol (Genaueres s. in § 165 C.) S. auch § 170.

Häufiger wird mit Alkohol gehärtet. Man legt die vorgehärteten Objekte hinein und belässt sie darin, bis sie die richtige Konsistenz haben (1 Tag bis mehrere Wochen lang). Das Gefäss mit dem Alkohol darf aber nicht fest verschlossen sein, sondern muss wenigstens zum Theil offen stehen.

Ueber die Stärke des Alkohols variiren die Angaben sehr — sie gehen bis zu 50 % herab — aber die Experimente von Busse (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 49), die ich (Lee) bestätigen kann, haben diesen Punkt wohl definitiv erledigt. Nach Busse ist etwa 85 %iger der beste, sowohl für die Durchsichtigkeit als auch für die

Konsistenz der Masse. Aber beim Schneiden muss letztere stets tüchtig mit Alkohol benetzt werden, da sie sehr rasch durch Verdunstung hart wird.

Apáthy (Mikrotechnik p. 122) hält nach wie vor seine Methode, in Alkohol von 70—80 % zu härten, für die allerbeste und verwendet Chloroform nur, wenn es sich um die doppelte Einbettung in Celloidin und Paraffin (§ 169) handelt. Glycerin benutzt er nur ausnahmsweise. (Ibid. p. 185 redet er von einem Anhärten in Dampf von 70—80 %igem Alkohol, einem Weiterhärten in Alkohol von derselben Stärke und einem Fertighärten in „Glycerin-Alkohol".)

Auch gefrieren kann man die Masse lassen. Sie wird zuerst durch Alkohol gehärtet, dann auf einige Stunden in Wasser gebracht, um den meisten Alkokol zu entfernen (aber ja nicht allen, sonst möchte die Masse zu steif gefrieren). Darauf kommt sie einen Augenblick in Gummischleim, damit sie auf dem Gefriertische des Mikrotoms festhält, und wird durchfroren. Die Schnitte legt man in warmes Wasser. Sollte die Masse zu steif gefroren sein, so wärmt man vor dem Schneiden das Messer mit warmem Wasser an. — S. auch unten § 821 sowie die Methode des Gefrierenlassens in Anethol nach Stepanow (Zeit. Wiss. Mikr. 17. Bd. 1900 p. 185). Sie soll Schnitte bis zu nur 3 μ Dicke liefern.

Florman (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 184) vermeidet bei der definitiven Härtung Alkohol und Chloroform ganz. Er schneidet die Blöcke aus, dreht sie um und lässt sie ruhig weiter abdunsten, wie oben angegeben.

Blum (Anat. Anzeiger 11. Bd. 1896 p. 724) verwendet zum Härten des Celloidins „mit Formol versetzten dünnen Spiritus".

164. Aufbewahren der Blöcke. Die gehärteten Blöcke können bis zu ihrer Verwendung in Alkohol von 70 % bleiben oder auch trocken aufbewahrt werden, indem man sie in geschmolzenes Paraffin taucht (Apáthy in: Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 45). Zahlen oder andere Bemerkungen lassen sich mit einem weichen Bleistift auf den Boden der Papierkästchen oder mit einem gelben Fettstift auf den Boden der Glasschalen schreiben. Nach dem Härten und Herausnehmen der Objekte finden sie sich dann im Kollodium abgedruckt vor.

Apáthy (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1897 p. 732) legt die Blöcke nach dem Abspülen mit Wasser in Glyceringelatine, auf die er dann gegen den Schimmel einige Stückchen Thymol bringt; vor dem Schneiden nimmt er diese wieder fort, erwärmt die Gelatine gelinde, wäscht den Block mit lauem Wasser ab und schneidet ihn sofort, wobei er das Messer mit Alkohol von 95 % befeuchtet.

165. Schneiden. Ist das Objekt ungefärbt, so wird es in Kollodium so durchsichtig, dass es sich oft nur schwer für das Schneiden orientiren lässt. Man färbt daher das Kollodium ein wenig, gerade

nur so viel, dass seine Umrisse auf den Schnitten sichtbar werden, und nimmt dazu entweder Pikrinsäure oder einen anderen brauchbaren Farbstoff, den man in Alkohol löst und dem Kollodium beimischt.

Man schneidet entweder mit feuchtem oder mit trocknem Messer und nimmt in jenem Falle zum Benutzen des Blockes und des Messers entweder Alkohol oder Glycerin oder ein Intermedium. Jede von diesen Methoden hat ihre Vorzüge und ihre Nachtheile, auch variirt dabei die Vorbehandlung des Celloidins. Das Schneiden unter Alkohol, die älteste Methode, wird gegenwärtig nicht mehr viel ausgeübt.

A. Schneiden unter Alkohol. Der Block wird auf dem Mikrotom befestigt wie folgt. Man nimmt ein Stück weiches Holz (oder für sehr kleine Objekte Hollundermark), das gut in die Objektklammer hinein passt, und bestreicht es mit Kollodium, das man dann trocknen lässt. Nun schneidet man den Block unten glatt, benetzt diese glatte Fläche erst mit absolutem Alkohol und dann mit Aether (oder lässt sie trocken werden), gibt einen Tropfen sehr dickes Kollodium auf das Stück Holz (oder Mark) und drückt die benetzte (oder getrocknete) Fläche fest darauf. Dann bringt man das Ganze in Alkohol von 70 % auf einige Stunden (auch kürzere Zeit), besser aber in Chloroform oder seine Dämpfe auf einige Minuten, um die Kittstelle hart zu werden zu lassen.

Für grosse Objekte darf man ja keinen Kork zum Einsetzen in den Objekthalter nehmen, namentlich wenn dieser wie ein Schraubstock geht, denn der Kork gibt nach, das Kollodium auch, und so wird das Objekt deformirt. Ist der Objekthalter hingegen ein Hohlcylinder, wie bei den neueren Jungschen Mikrotomen, so ist das zwar nicht so schlimm, aber das Holz quillt leicht im Alkohol und passt dann nicht mehr in den Objekthalter. Dagegen kann ich (Mayer) das zuerst von Jelinek (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 237) angegebene Stabilit, eine Art Hartgummi, die für elektrische Isolirungen angewandt wird (zu haben in brauchbarer Form bei R. Jung in Heidelberg) in jeder Beziehung empfehlen.

Das Messer muss beim Schneiden gehörig mit Alkohol von 50 bis 85 oder sogar bis 95 % benetzt werden. Irgend eine Tropfvorrichtung ist dazu gewiss gut. Apáthy (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 167) räth an, das Messer mit gelbem Vaselin einzufetten; es schneide besser, werde vom Alkohol nicht angegriffen, und dieser sei auf der Schneide nicht so leicht beweglich. Man spannt das

Messer so wenig quer wie möglich ein. Sehr brüchige Schnitte kann man mit Kollodium bestreichen (§ 146).

Man bringt die Schnitte entweder sofort in Alkohol (von 50—85 oder 95 %) oder, falls man sie in Serien anordnen will, so behandelt man sie, wie im folgenden Kapitel (§ 197 ff.) angegeben ist.

B. Schneiden unter Glycerin, Cedernöl etc. Meyer (Biol. Centralbl. 10. Bd. 1890 p. 508) bringt den Block auf 24 Stunden in Glycerin und benetzt das Messer entweder mit Glycerin oder mit Alkohol von 50—70 %. — Bumpus (Amer. Natural. Vol. 26 1892 p. 80) durchtränkt den Block nach der Härtung in Chloroform mit weissem Thymianöl oder sonst einem guten Intermedium (§ 168), trocknet ihn unten ab, benetzt ihn dort mit Aether, klebt ihn mit dicker Celloidinlösung auf Holz auf und bringt ihn so in Chloroform, um die Kittstelle fest werden zu lassen. Mit dem Intermedium benetzt er aber nicht nur das Messer, sondern auch die Oberfläche des Blocks nach jedem Schnitte. — Eycleshymer (ibid. p. 357) empfiehlt zum Durchtränken Glycerin oder sein Gemisch (§ 168), Gilson (nach brieflicher Mittheilung) Cedernöl (§ 166), Fish Thymianöl mit Rizinusöl (§ 168), Gage (Trans. Amer. Micr. Soc. Vol. 17 1896 p. 365) ein Gemisch von 3 Theilen Xylol mit 1 Th. Rizinusöl. S. auch die spezielle Methode von Jordan in § 170.

C. Schneiden ohne Flüssigkeit. Nach Lee (Vade-Mecum 4. Edit. 1896 p. 111) bringt man die im letzten Celloidinbade befindlichen, aber noch nicht an der Luft vorläufig gehärteten Objekte in eine Steinachsche Siebdose oder einen Exsiccator, auf dessen Boden ein Theelöffel voll Chloroform ausgegossen ist. (Die Objekte können Monate lang hierin ohne Schaden bleiben.) Sobald die Masse an der Oberfläche hart genug geworden ist, löst man sie aus dem Gefässe los und legt sie ab und zu um, damit die Chloroformdämpfe gleichmässig einwirken können. Ist sie einigermaassen hart, so kommt sie in das Gemisch von Gilson (s. § 166), das aber zuerst aus 1 Theil Chloroform und 1—2 Theilen Cedernöl bestehen muss. Nach und nach wird von dem Oel zugesetzt, bis zuletzt fast nur noch reines Cedernöl da ist. So wie nun die Masse ganz durchsichtig ist, bringt man sie an die Luft, wo das meiste Chloroform verdunsten wird; man kann sie dann auf die Objektklammer mit einem Tropfen dicken Kollodiums (s. oben p. 113) aufkitten und entweder sofort schneiden oder in einer gut verschlossenen Flasche beliebig lange unverändert

aufheben. Jedenfalls schneidet man trocken; die angeschnittene Fläche des Blocks trocknet selbst in Stunden nicht so aus, dass Schaden entsteht. Oft schneidet sich die Masse besser, wenn man ihr Chloroform an der Luft noch einige Stunden abdunsten lässt.

Härten kann man auch direkt in dem Gemisch von Chloroform und Cedernöl statt in Chloroformdämpfen, aber die Härtung wird nicht so gut. Desgleichen kann man direkt mit reinem Cedernöl aufhellen, indessen geht das sehr langsam, während das obige Gemisch äusserst rasch wirkt.

166. Schnellhärtung nach Gilson (La Cellule Tome 6 1890 p. 123; einige Aenderungen beruhen auf brieflicher Mittheilung vom April 1892 an Lee). Das Objekt wird entwässert, mit Aether durchtränkt und in ein Reagensglas mit Kollodium oder dünner Celloidinlösung gebracht. Das Glas kommt dann in geschmolzenes Paraffin zu stehen, und so dickt man das Kollodium, das ja schon bei niedriger Temperatur kocht, bis zum Syrup (etwa bis auf 1/3 seines Volumens) ein. Dann wird es auf einen Block von gehärtetem Celloidin ausgegossen und mit diesem in Chloroform oder einem Gemisch von Chloroform und Cedernöl etwa 1 Stunde lang gehärtet. War es in reinem Chloroform gewesen, so muss es erst noch mit Cedernöl durchtränkt werden, sonst aber kann es direkt unter Cedernöl geschnitten werden.

167. Färben der Schnitte. Die Schnitte können entweder frei oder aufgeklebt (auf Glas oder Papier) gefärbt werden; im Allgemeinen ist es aber nicht nöthig, ja nicht einmal erwünscht, das Celloidin vor dem Färben aufzulösen, denn es färbt sich gewöhnlich nicht mit oder gibt doch die Farbe nachher im Alkohol wieder ab. Einige Farbstoffe jedoch tingiren es stark und gehen später nicht wieder ordentlich heraus; in solchen Fällen muss man es also vorher mit absolutem Alkohol oder Aether aus den Schnitten wegschaffen.

168. Einschliessen der Schnitte. In der Regel lässt man das Celloidin an dem Schnitte sitzen, weil es ihn ja vortrefflich zusammenhält; ist noch dazu das Objekt in toto gefärbt worden, so braucht man nur die Flüssigkeit, unter der man geschnitten hatte (also Alkohol, Glycerin, Cedernöl etc.), aus dem Schnitte zu verdrängen und in der richtigen Weise durch Glycerin oder Balsam zu ersetzen, denn in beiden wird das Celloidin ganz durchsichtig. Hat man also unter Glycerin oder Alkohol geschnitten, so bietet die Uebertragung in das Glycerin gar keine Schwierigkeiten (ebenso wenig auch in die Färbgemische); sollen die Schnitte aber aus dem Glycerin oder Alkohol in ein Harz, so muss man sie zuerst ent-

wässern: entweder mit Alkohol von 95—96 % (nicht mit absolutem, denn der greift das Celloidin an) oder (nach NIKIFOROW in: Zeit. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 189) mit einem Gemisch von absolutem Alkohol und Chloroform zu gleichen Theilen. Als Intermedium nimmt man natürlich eine Flüssigkeit, die das Kollodium nicht angreift.

Am meisten werden hierzu empfohlen Origanumöl, Bergamottöl, Cedernöl und Chloroform. Das Gemisch von DUNHAM (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 175) besteht aus 3—4 Theilen weissem Thymianöl und 1 Theil Nelkenöl, das von FISH (Proc. Amer. Micr. Soc. Vol. 15 1893 p. 86 sowie Brief an Lee) aus 3 Theilen Thymianöl und 1 Theil Rizinusöl, das von WEIGERT (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 480) aus 3 Theilen Xylol und 1 Theil wasserfreier Karbolsäure (darf nicht bei basischen Theerfarbstoffen gebraucht werden, da es sie auszieht; bei solchen ersetzt man die Karbolsäure durch Anilin), das von EYCLESHYMER (Amer. Natural. Vol. 26 1892 p. 356) aus Bergamottöl, Cedernöl und Karbolsäure zu gleichen Theilen. — Anilin schafft sogar 70%igen Alkohol fort, aber wenn man es hinterher nicht sorgfältig entfernt (durch Einlegen der Schnitte auf 24 Stunden in Chloroform), so werden später die Präparate braun.

Origanumöl wirkt nach den Sorten ganz verschieden: einige nehmen den Alkohol nicht gut weg, andere lösen das Kollodium auf, noch andere machen es runzelig. — Das von JORDAN (Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1898 p. 51) empfohlene Linaloëöl lässt sich nach meinen (MAYER) Erfahrungen zwar brauchen, glättet aber die Schnitte nicht so gut wie Bergamottöl. Ueber Pyridin mit Xylol s. oben § 104.

Hat man hingegen unter einem Intermedium oder trocken geschnitten und will die Schnitte nicht erst färben, so fällt natürlich die Entwässerung ganz fort und man bedient sich zum Einschliessen in Balsam direkt eines der oben aufgezählten Mittel, während man zum Einschliessen in Glycerin zunächst Alkohol von 95 % und später schwächeren nimmt.

S. auch unten § 197 ff. die Verfahren beim Aufkleben der Celloidinschnitte.

169. Doppelte Einbettung in Kollodium und Paraffin. Diese komplizirte Methode wird, obwohl selten, für Objekte angewandt, die sehr dünne Schnitte liefern sollen, aber zu brüchig für Paraffin allein sind. Nach GARBINI (Manuale Tecn. Mod. Micr. Verona 1885 p. 81) ist sie zuerst von Heider ausgeübt worden.

KULTSCHITZKY (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 48) durchtränkt das Objekt mit Kollodium, dann mit Oel von Origanum vulgare, bringt es in eine warme (höchstens 40° C.) Lösung von Paraffin in Origanumöl und zuletzt in Paraffin. Man kann trocken schneiden und den Block trocken aufheben. — RYDER (Journ. R. Micr. Soc. London f. 1888 p. 512) nimmt statt des Oeles Chloroform.

IDE (La Cellule Tome 7 1891 p. 347, Tome 8 1892 p. 114) bettet das Objekt nach Gilson (§ 166) in Kollodium ein, kocht dieses in einem Reagensglase 40 Minuten

lang, bringt es dann mit dem Objekt (dies gilt für kleine Objekte) auf 15 Minuten in 30° C. warmes Chloroform, das ¼ Paraffin aufgelöst enthält, und zuletzt auf 10 Minuten in reines geschmolzenes Paraffin.

Field & Martin (Bull. Soc. Z. France Vol. 19 1894 p. 48; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 6) empfehlen folgende gleichzeitige Einbettung: sie lösen trockenes Celloidin in einem Gemisch von absolutem Alkohol und Toluol zu gleichen Theilen, sodass das Ganze die Konsistenz von Nelkenöl annimmt, und sättigen dies dann mit Paraffin bei einer Temperatur von 20—25° C. Das Objekt durchtränken sie mit dem Alkohol und Toluol und bringen es darauf in obige Lösung; zuletzt betten sie es in Paraffin ein, und zwar entweder nach Bütschli mit Chloroform (oben p. 87) oder, indem sie die obige Lösung in der Wärme unter stetem allmählichem Zusatz von Paraffin verdunsten lassen. — Samassa (Arch. Entwickelungsmech. 7. Bd. 1898 p. 2) nimmt zum Lösen des Celloidins und Paraffins ein Gemisch von 2 Th. Toluol, 1 Th. absol. Alkohol und 1 Th. Aether und zum Härten des Blockes und Einbetten in Paraffin Petroläther, der nicht so stark härte wie Chloroform. — Diese Modifikation habe ich (Mayer) nicht geprüft, aber bei der Vorschrift von Field & Martin kann von einer regelrechten Einbettung in Celloidin nicht die Rede sein, denn das Celloidin dringt nicht gut ein, höchstens werden die Theile des Objektes dadurch mit einander verklebt, und das mag ja unter Umständen vortheilhaft sein. Von anderer Seite wurde mir allerdings die Methode sehr gerühmt.

Sabussow (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 353) bettet kleine Turbellarien nach E. Meyer aus 95%igem Alkohol zunächst in Photoxylin (je 24 Stunden lang in eine ½%ige, 2%ige und 5%ige Lösung in 95%igem Alkohol und Aether zu gleichen Theilen) ein, härtet den Phot.-Tropfen mit dem Objekt darin in Chloroform 24 Stunden lang, schneidet das überflüssige Phot. vom Objekt weg und erwärmt letzteres je 1 Stunde lang erst in Chloroform und Paraffin bei 35°, dann in reinem Paraffin bei 55° C. — S. auch Meyer in: Mitth. Z. Stat. Neapel 14. Bd. 1901 p. 295.

Mitrophanow (Arch. Z. Expér. (3) Tome 3 1896 p. 617) bringt die Objekte auf 1—3 Tage in eine ½- oder 1%ige Lösung von Photoxylin, darauf zum Härten in Alkohol von 70%, schneidet dann den Block genau zurecht, entwässert ihn in Alkohol von 95%, durchtränkt ihn mit Bergamottöl, Origanumöl oder Chloroform, sättigt das Intermedium (mit dem Block darin) bei 35—38° C. mit Paraffin und schliesst den Block in Paraffin (von 48—52° Schmelzpunkt) ein. Schnitte lassen sich mit einem Minotschen Mikrotom bis zu 2 μ Dicke erhalten.

S. auch § 170 die Methode von Jordan.

170. Einbetten in Celloidin und Cedernöl oder Nelkenöl. Jordan (Zeit. Wiss. Mikr. 17. Bd. 1900 p. 193) verwendet zur Herstellung der Celloidinschnitte absichtlich das Celloidin nicht rein, sondern mit Cedernöl vermischt; die beiden Bäder bestehen aus Gemischen von je 1 Theil Cedernöl mit 4 Theilen 1%iger resp. 5 Theilen 8%iger gewöhnlicher Celloidinlösung. Das gut durchtränkte Objekt wird erst kurze Zeit Chloroformdämpfen ausgesetzt und nach Bildung einer Haut in einem (eventuell mehrere Male zu erneuernden) Gemisch von 5 Th. Chloroform und 1 Th. Cedernöl gehärtet, auch unter dieser Flüssigkeit geschnitten. Die Schnitte werden auf dem vorher mit Eiweiss bestrichenen und

mit einem Gemisch von Chloroform und wenig Cedernöl gut benetzten Objektträger ausgebreitet und haften bereits nach einigen Minuten Trocknens (besonders in der Wärme) glatt und sehr fest. — Die Doppeleinbettung ist analog: Durchtränken der Objekte mit einem Gemisch von 4 Th. 2—3 %igem Celloidin und 1 Th. Cedernöl; Härten in 4 Th. Chloroform und 1 Th. Cedernöl; nochmaliges Durchtränken mit einer Lösung von Paraffin in Chloroform (oder in Benzol mit etwas Cedernöl) bei 30° C.; Einbetten in mehrere Mal zu wechselndes reines Paraffin. Kleine Objekte sollen sich in Serien von 2 µ zerlegen lassen. Objekte, die wegen der ziemlich hohen Temperatur bei dieser Doppeleinbettung zu hart werden, darf man aber nach dem nochmaligen Durchtränken nicht in das reine Paraffin bringen, sondern muss das Benzol bei etwa 30° C. völlig verdunsten lassen, was bis zu einer Woche dauern kann.

Stepanow (Zeit. Wiss. Mikr. 17. Bd. 1900 p. 185) verwendet das Celloidin nicht rein, sondern im Gemisch mit Nelkenöl (s. oben § 160), und bringt unter Umständen die Objekte ebenfalls durch Benzol in Paraffin. — S. auch oben § 160 das Cell. inelasticum von Unna.

B. Andere kalte Massen.

171. Kalte Gelatine. Brunotti (*Journ. Bot. Tome 6 1892 p. 194; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1892 p. 706) löst 20 g Gelatine durch Erwärmen in 200 ccm dest. Wasser, filtrirt und setzt 30 bis 40 ccm Eisessig und 1 g Sublimat hinzu. Bei 15° ist die Masse dickflüssig. Die Objekte werden mit verdünnter Masse (1 Vol. auf 2—3 Vol. Wasser) durchtränkt, dann in die unverdünnte Masse eingebettet und in Alkohol, Kaliumbichromat, Pikrinsäure etc. gehärtet. Mithin wird hierbei die Erwärmung ganz vermieden.

172. Gummiglycerin. Servel (Arch. Phys. Paris (2) Tome 1874 p. 974) bettet Objekte aus Alkohol in Gummischleim, dem auf 3 Theile 1 Theil Glycerin zugefügt worden war, ein und lässt die Masse trocknen, wobei das Glycerin das völlige Hartwerden verhindert. Aehnlich Joliet (Arch. Z. Expér. Tome 10 1882 Notes p. 43).

Nach Joliet hängt es vom Objekt und von der Jahreszeit ab, wie viel Glycerin man nehmen muss: im Winter oder bei feuchtem Wetter weniger als im Sommer oder bei trockenem Wetter. Oft ist es auch gut, das Objekt vorher mit Glycerin zu durchtränken, dann aber muss man demgemäss weniger Glycerin zum Gummi setzen.

Das Objekt wird in das Uhrglas gelegt, und das Ganze 1—4 Tage zum Trocknen hingestellt. Ist es hart wie Knorpel geworden, so wird ein Block mit dem Objekt darin herausgeschnitten, umgekehrt und wieder zum Trocknen hingelegt, entweder an den Ofen oder die Sonne, am besten aber einfach an die Luft. Der Block kann, so wie er ist, fast unbegrenzte Zeit aufbewahrt werden. Im Allgemeinen wartet man mit dem Schneiden so lange, bis das Gummi sich nicht mehr leicht biegen lässt, also etwa eine Woche lang. Die Schnitte (wie

Verf. schneidet, gibt er nicht an) befreit man auf dem Objektträger durch Wasser vom Gummi und schliesst sie in Glycerin ein.

Material aus Chromsäure hat bereits 1862 MÜLLER (Würzburger Nat. Zeit. 3. Bd. p. 21) in Gummiglycerin eingebettet.

173. Gummi arabicum. STRICKER (Handbuch d. Gewebelehre 1. Bd. 1871 p. XXIV) bettet das Objekt aus Alkohol in eine dicke Lösung von Gummi in einem Papierkästchen ein, bringt das Ganze in Alkohol und schneidet es nach 2—3 Tagen. — Diese einfache Methode ergibt sehr gut schneidbare Massen, falls man den Alkohol von der richtigen Stärke, nämlich von etwa 80°, nimmt (MAYER in: Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 27).

174. Schellack. Wird von HYATT (Amer. Micr. Journ. Vol. 1 1880 p. 8; Journ. R. Micr. Soc. London Vol. 3 1880 p. 320) zum Schneiden harter Chitingewebe empfohlen, die aus mehreren Stücken bestehen (Legebohrer, Stachel etc.), da in dem Schellack alle Theile ihre natürliche Lage behalten. Eingebettet wird in dicke Schellacklösung, die man nach dem Verdunsten des Alkohols durch warmes Wasser erweicht und dann schneidet.

C. Schleifmassen.

175. Kopal. Nach KOCH (Z. Anzeiger 1. Bd. 1878 p. 36) bereitet man eine schwache Lösung von Kopal in Chloroform, indem man Kopal mit Sand in einem Mörser verreibt, Chloroform darauf giesst und filtrirt. In diese Lösung bringt man die vorher gefärbten und gut entwässerten Objekte (nur kleine Stücke nehmen!) und lässt das Chloroform ganz langsam verdampfen, am besten, indem man das Gefäss auf eine Thonplatte mit einem brennenden Nachtlicht darunter stellt. Sobald die Lösung nun so dick geworden ist, dass ein Tropfen davon beim Herausnehmen Fäden zieht, die beim Erkalten brüchig werden, nimmt man die Objekte heraus und lässt sie zum raschen Erhärten mehrere Tage auf der Thonplatte liegen. Sind sie so hart geworden, dass man mit dem Nagel keinen Eindruck mehr hinein machen kann, so schneidet man mit einer Laubsäge Platten davon, schleift sie auf der einen Seite auf einem Abziehstein eben und kittet diese mit Kanadabalsam oder Kopallösung auf einen Objektträger, der wiederum einige Tage auf der warmen Thonplatte liegen muss. Endlich werden die Schliffe erst auf einem Schleifstein, dann auf einem Abziehstein dünn geschliffen und polirt, mit Wasser abgewaschen und in Balsam eingeschlossen.

Man kann die Objekte auch ungefärbt einbetten, den Kopal aus den Schliffen durch Chloroform ausziehen, diese, falls nöthig oder erwünscht, entkalken und dann färben. Mitunter kittet man auch wohl vortheilhaft den Schliff nach dem Ausziehen des Kopals mit

hartem Kanadabalsam auf den Objektträger, entkalkt dann vorsichtig nur die hervorstehende Partie, wäscht sie aus und färbt sie.

Diese ursprünglich nur für Korallen ausgedachte Methode ist offenbar auf alle anderen Objekte ausdehnbar, in denen harte und weiche Gewebe innig miteinander verbunden sind. So ist sie denn auch neuerdings von Weil und Röse zum Studium der Knochen und Zähne von Wirbelthieren verwandt worden, freilich mit leichten Aenderungen (statt des Kopals wird Balsam oder Dammarharz benutzt, s. § 782); s. auch den folgenden §.

176. Kanadabalsam wird von Johnston-Lavis & Vosmaer (Journ. R. Micr. Soc. (2) Vol. 7 1887 p. 200) zum Schleifen von Poriferen mit den Weichtheilen benutzt. Von dem in absolutem Alkohol gehärteten Schwamm wird eine etwa 5—12 mm dicke Scheibe abgeschnitten, durchgefärbt, entwässert, ganz langsam (durch steten Zusatz von Benzol) in Benzol und von da ebenso vorsichtig erst in dünnen, dann in dicken Benzolbalsam gebracht. Dann bleibt sie 1 Tag an der Luft liegen und wird nun in einem Luftbade (Boden und Wände aus Asbest, um die Wärme ganz gleichmässig zu vertheilen) bei etwa 80 ° C. in einigen Tagen oder Wochen getrocknet, bis der Balsam hart genug ist. Beim Schleifen wird der Stein mit Seifenlösung (in Alkohol von etwa 50 %) benetzt.

177. Schellack. Giesbrecht (Morph. Jahrb. 6. Bd. 1880 p. 95) umgibt die Stacheln von Seeigeln, nachdem er sie in absolutem Alkohol gekocht hat, mit einem dicken Cylinder von recht heissem geschmolzenem Schellack, schneidet diesen Cylinder mit der Laubsäge in dünne Scheiben, schleift und polirt letztere erst auf der einen Seite, kittet diese wieder mit Schellack auf einen Objektträger, schleift und polirt die andere Seite ebenfalls und schliesst den Schliff in Balsam ein. Oder den erst auf der einen Seite polirten Schliff befreit er durch kochenden absoluten Alkohol ganz vom Schellack, bringt ihn auf wenigstens 24 Stunden in eine schwache alkoholische Lösung von Fuchsin, dann in Wasser, um das Fuchsin in den Kanälen niederzuschlagen, trocknet ihn, kittet ihn mit hartem Balsam auf und bearbeitet nun auch die andere Seite wie oben. Aehnlich lassen sich Schalen von Muscheln, Schnecken und Rhizopoden behandeln. Auf die Weichtheile wird indessen hierbei keine Rücksicht genommen.

178. Kolophonium und Wachs. Ehrenbaum (Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 414) schmilzt 10 Theile Kolophonium und 1 Theil Wachs zusammen (das Wachs verringert die Sprödigkeit), durchtränkt die Objekte damit und schleift sie in der gewöhnlichen Weise dünn. Die Masse wird erst mit Terpentinöl, dann mit Chloroform ausgezogen. Ebenfalls nur für harte Gegenstände (Schalen, Zähne etc.) ohne Weichtheile.

Gefriermassen.

179. Allgemeines. Ueber den Werth der Gefriermethode für histologische Zwecke lauten die Urtheile sehr verschieden. In der Regel wird sie von den Pathologen ebenso gerühmt wie von den Zoologen getadelt, von Jenen viel ausgeübt, von Diesen vernachlässigt. Jedenfalls kann sie nicht als eine allgemeine Methode gelten, mag aber in manchen Fällen gute Dienste leisten, namentlich wenn es sich um recht rasche Erlangung von einigen Schnitten zur Orientirung über den Bau eines kompakten Gewebes handelt. Zu unterscheiden ist aber dabei, ob man ganz frische Objekte ohne jeglichen Zusatz gefrieren lässt, oder konservirte, die dann vorher mit Wasser oder einer wässerigen Flüssigkeit durchtränkt werden müssen. In warmen Klimaten ist es übrigens namentlich im Sommer nur schwer möglich, überhaupt die Objekte so gut zum Gefrieren zu bringen, dass sie brauchbare Schnitte ergeben; speziell gilt dies für die frischen, da die Schnitte auf dem Messer ja sofort wieder aufthauen.

Um die Bildung von Eiskristallen in den Objekten möglichst zu verhüten, durchtränkt man diese mit einer Masse, die beim Gefrieren hart und zähe wird, z. B. mit einer Lösung von Gummi arabicum.

Eine Einrichtung am Gefriermikrotom zur Verwendung flüssiger Kohlensäure statt des Aethers beschreibt Johne (*Zeit. Thiermed. (2) 1. Bd. 1897 p. 366; Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 370). Für Stücke von 8—10 mm Dicke und 2 cm Länge und Breite soll es genügen, die Kohlensäure nur 3—5 Sekunden lang ausströmen zu lassen. — S. auch Jung in: Verh. Ges. D. Naturf. Aerzte 69. Vers. 1898 2. Theil 1. Hälfte p. 129.

180. Gefrierenlassen frischer Gewebe. Solger (Bull. Accad. Med. Roma Anno 21 1895 p. 88; Festschrift Gegenbaur Leipzig 2. Bd. 1896 p. 211) empfiehlt sehr das Schneiden gefrorener Objekte (Speicheldrüse, Thränendrüse, Niere, Leber etc.). Diese werden ganz frisch lediglich im eigenen Saft gefroren, aber jedes Stück nur einmal, und dann macht man aus freier Hand rasch möglichst viele Schnitte, bringt sie ohne jeglichen Zusatz auf den Objektträger, zieht gegen die Verdunstung um das Deckglas einen Wachsrand und untersucht sie sofort. Hat man viel Material, so kann man ein zweites Stück gefrieren lassen und die Schnitte nach Belieben konserviren. Man lasse aber nie das ganze Stück gefrieren, sondern nur bis zur Hälfte seiner Höhe (etwa 2 bis 3 mm hoch), entferne die ungefrorene Schicht und schneide nur die mittlere Zone.

181. Massen aus Gummi und Syrup. HAMILTON (Journ. Anat. Phys. London Vol. 12 1878 p. 254) durchtränkt die Gewebe mit Zuckersaft (2 Theile Zucker, 1 Theil Wasser), legt sie eine Stunde vor dem Schneiden in dicken Gummischleim und umgibt sie mit diesem auch auf dem Objekthalter des Mikrotoms. — COLE (Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 4 1884 p. 318) verwendet direkt ein Gemisch von Gummischleim und Zuckersaft.

182. Andere Massen. Dextrinlösung nach WEBB (Journ. R. Micr. Soc. London f. 1890 p. 113). Gelatine nach SOLLAS (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 24 1884 p. 163). Gelatine mit Gummi arab. und Traganth nach JACOBS (Amer. Natural. Vol. 19 1885 p. 734; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1888 p. 900). Hühnereiweiss nach ROLLETT für frische Muskeln (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1896 p. 92). Anisöl nach KÜHNE (s. oben § 125) und MOORE (*Amer. Month. Micr. Journ. Vol. 15 1894 p. 373; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1895 p. 247).

PLENGE (Arch. Path. Anat. 144. Bd. 1896 p. 409) härtet die Gewebe einige Stunden bis Tage lang in 4%igem Formol, schneidet Scheiben von 1 mm Dicke ab und lässt sie gefrieren. Die Schnitte von 30—10 μ Dicke fängt er in Alkohol von 50% auf. (S. hierzu oben p. 66 BLUM.) — Ueber Erhärtung des Formols durch Resorcin bis zur Schnittkonsistenz, sodass sich kleine Objekte (z. B. Rückenmark) ohne Alkohol einbetten lassen, s. DÖLLKEN in: Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 33.

— — - —

9. Kapitel.

Aufkleben der Schnitte.

183. Wahl der Methode. Für die gewöhnlichen Arbeiten sind zu empfehlen: 1) für schon gefärbte Paraffinschnitte Schellack nach Giesbrecht oder Kollodium nach Schällibaum; 2) für Paraffinschnitte, die auf dem Objektträger gefärbt werden sollen, Eiweiss nach Mayer, falls aber die Schnitte stark gefaltet sind, oder falls das Eiweiss sich mit färben würde, Wasser (oder Alkohol); 3) für Celloidinschnitte Eiweiss nach Mayer, und für sehr grosse Schnitte die Methode von Weigert.

Das Aufkleben der Schnitte auf Deckgläser statt auf Objektträger ist nach unserer Meinung nur in geschickten Händen einigermassen rationell, auch so wenig gebräuchlich, dass wir im Folgenden ganz davon absehen. Selbst Carazzi (Manuale p. 106), der es für Paraffinschnitte sehr rühmt, klebt die Celloidinschnitte doch auf den Objektträger.

Methoden für Paraffinschnitte.

184. Aufkleben mit Wasser oder Alkohol. Diese Methode ist wohl zuerst von Gaule (Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1881 p. 156) beschrieben worden, der den Objektträger mit Alkohol benetzte, die Schnitte darauf mit einem Pinsel voll Alkohol ausbreitete, sanft erwärmte, das Deckglas auflegte, mit Xylol das Paraffin entfernte und in Xylolbalsam einschloss. Später ist sie aber bedeutend verbessert worden und wird gegenwärtig entweder so ausgeführt, dass man die Schnitte sich auf warmem Wasser strecken lässt und dann erst auf den Objektträger bringt (s. unten p. 124), oder dass man umgekehrt sie erst auf den nassen Objektträger legt und dann durch Erwärmen streckt. Letztere Methode ist als die einfachere vorzuziehen. Man verfährt dabei am besten wie folgt.

Der gut gereinigte Objektträger wird, wenn es sich nur um wenige Schnitte handelt, mit Wasser tüchtig benetzt; man kann

hierzu eine Tropfflasche oder einen reinen Pinsel benutzen. Die Schnitte werden dann aufgelegt und strecken sich schon jetzt einigermassen aus, wenn sie vorher etwas eingerollt gewesen waren; aber die feinen Falten verschwinden noch nicht. Man erwärmt nun den Objektträger auf etwa 40° C., jedenfalls aber nicht so stark, dass das Paraffin schmilzt; dies thut man entweder auf einer schwach erwärmten Platte oder auf einem Wasserbade, kann es auch, obwohl man dabei sehr gut aufpassen muss, über einer kleinen Flamme besorgen. Haben sich dann alle Falten geglättet, so ordnet man die Schnitte, falls sie dabei auf dem Wasser umhergeschwommen sind, mit dem Pinsel nochmals, lässt durch allmähliches Neigen das Wasser vom Objektträger gut abfliessen und legt ihn zum völligen Trocknen bei Seite. Hat man keine Eile, so bleibt er über Nacht an einem staubfreien Orte liegen, und man kann ihn nun, nachdem man das Paraffin rasch geschmolzen hat, in Chloroform (oder Xylol etc.), von da in Alkohol von 100°, 90°, 70°, dann in Wasser, in die Färblösungen u. s. w. bringen, ohne dass sich in der Regel die Schnitte ablösen werden. Hat man Eile, so trocknet man den Objektträger bei etwa 40° C.; dies kann in 1/2 Stunde geschehen sein, besser aber wartet man, namentlich bei dicken Schnitten, einige Stunden.

Auch der Methode von Gaskell und Anderen kann man sich bedienen, namentlich wenn es sich um wenige grosse Schnitte oder um Schnittbänder handelt, wo eine Beschädigung der Schnitte beim zweimaligem Uebertragen (erst auf das warme Wasser, dann auf den Objektträger) nicht so leicht zu befürchten ist. S. oben § 148 und unten p. 128 (Mann).

Zum Strecken der Schnitte hat Lee (Vade-Mecum 5. Edit. 1900 p. 141) im warmen Wasserbade eine ziemlich dicke Glasplatte liegen; diese nimmt er hervor, legt den Objektträger darauf und kontrollirt eventuell die Dehnung der Schnitte mit der Lupe.

Sind viele kleine Schnitte, von denen keiner aus der Reihe kommen darf, aufzukleben, so muss man das Wasser mit Vorsicht auf den Objektträger bringen. Dazu dient ein feiner Pinsel: man zieht damit unter Anhauchen des Glases einen Strich, der gerade für eine Reihe Schnitte ausreicht, legt diese hin, streicht nun erst für die zweite Reihe das Wasser auf, kurz, geht mit dem Wasser so sparsam um, dass möglichst wenig Gefahr für das Wegschwimmen der Schnitte bestehen kann. Zu wenig Wasser darf man jedoch auch nicht nehmen, denn die Schnitte sollen ja erst später alle auf einmal festgeklebt werden. Hier wird also an die Geschicklichkeit des Arbeiters stark appellirt. Hat man aber alle Schnitte glücklich in Reihe und Glied

liegen, so lässt man mit dem Pinsel an Anfang und Ende jeder Reihe etwas Wasser hinzufliessen, damit die Schnitte sich ordentlich ausdehnen können, erwärmt den Objektträger und verfährt überhaupt wie oben angegeben. Mit einiger Uebung lassen sich viele Schnitte, auch wenn sie alle einzeln hineingelegt werden (Schnittbänder machen natürlich lange nicht so viel Last), ganz sicher in schönster Ordnung festkleben, vorausgesetzt, dass das Wasser sich auf dem Objektträger gut ausbreiten will und nicht in Tropfen zusammenläuft.

Die Reinigung des Objektträgers zu diesem Behufe ist nicht leicht und auch, wie uns scheint, nicht immer absolut sicher zu erreichen. Man hauche zuerst über das Glas hin und brauche es nur dann ohne Weiteres, wenn dabei der Hauch ganz gleichmässig auftritt und verschwindet, weil nur so das Wasser sich gut ausbreiten wird. Ist das aber nicht der Fall, so nehme man etwas Speichel, verreibe ihn mit dem (natürlich von Fett freien) Finger auf dem Glase, spüle ihn mit Wasser weg und benutze nun den Objektträger sofort, ohne ihn abzutrocknen. Heidenhain (Festschr. Kölliker Leipzig 1892 p. 114) reibt den Objektträger mit einem nassen Tuche energisch ab, verfährt also ähnlich. Noch besser aber ist das gründliche Putzen des Glases mit feiner Schlemmkreide. Helfen indessen alle diese Mittel nicht, so muss man andere Objektträger wählen.

Suchannek (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1891 p. 464) schiebt die Schuld für das Zusammenlaufen des Wassers auf die Gegenwart von Fett. Dies wird in der Regel zutreffen, indessen hilft auch mitunter das Reinigen mit Xylol und das Putzen mit einem ganz reinen Tuche nicht. Vielleicht trägt doch die Sorte des Glases zuweilen Schuld daran. Jedenfalls haben alle irgendwie sauren Flüssigkeiten gar keine Neigung dazu, sich auf dem Glase ordentlich auszubreiten, während die alkalischen es viel eher thun. Ein Minimum von Mayerschem Eiweiss, mit dem Finger auf dem Objektträger verrieben, thut Wunder, ist aber nur dann zu empfehlen, wenn man die Schnitte nicht später in Flüssigkeiten zu bringen hat, die das Eiweiss auflösen (z. B. schlechtes Pikrokarmin).

Das Reinigen mit Schlemmkreide nach De Groot (Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1898 p. 62), übrigens den Glasern wohlbekannt, ist sehr zu empfehlen. Nach meinen (Mayer) Versuchen leisten Magnesium- oder Natriumkarbonat dasselbe, jedenfalls mehr als Speichel.

Vom Aufkleben der Schnitte mit Alkohol ist man gänzlich abgekommen, obwohl schwacher (etwa von 30 %) dafür recht brauchbar ist. Ob man nun destillirtes oder gewöhnliches Wasser nimmt, bleibt sich gleich — vielleicht ist letzteres sogar noch besser — und man wird auch wohl nur äusserst selten bei der Weiterbehandlung der Schnitte (z. B. beim Färben) auf die Salze des ge-

wöhnlichen Wassers Rücksicht zu nehmen brauchen. Dagegen ist das Wasser überhaupt bei gefärbten Schnitten durchaus nicht harmlos, greift vielmehr beim Strecken und langsamen Trocknen in der Wärme manche Farbe an oder zieht sie etwas aus. Man darf aber hieraus ferner darauf schliessen, dass es unter Umständen auch in den Schnitten selber Veränderungen herbeiführen wird, die nicht vernachlässigt werden dürfen.

In der Litteratur ist uns ein Hinweis auf diese böse Eigenschaft des Wassers nicht begegnet; man scheint sie, da man gefärbte Schnitte wohl nicht damit aufklebt, bisher übersehen zu haben. Ein fernerer Uebelstand ist der, dass ein Erwärmen dicht bis an den Schmelzpunkt des Paraffins mitunter die Schnitte übermässig dehnt; namentlich gilt dies vom Bindegewebe. Indessen lässt sich diese Klippe ja leicht vermeiden. Heidenhain (l. c.) warnt ebenfalls vor zu starkem Erwärmen, da Kerne und Zellen alsdann sehr schrumpfen.

Ueber die Methode von Mayer, beim Aufkleben gleichzeitig zu färben, s. oben p. 7.

In der Regel haften die Schnitte, wenn sie sorgsam aufgeklebt wurden, so fest am Glase wie nach irgend einer anderen Methode. Absolut sicher haften sie jedoch nicht, besonders wenn sie aus vielen Partikeln bestehen. Dicke kleine Schnitte kleben meist nicht so fest wie grosse dünne. Besonders übel sind natürlich Schnitte mit chitinigen oder anderen Theilen, die sich im Wasser lebhaft verziehen. Alle solche Fälle und auch der Umstand, dass sich Gewebe, die mit Osmium- oder Chromgemischen fixirt sind, nicht so fest anlegen, wie andere, gelten vom Aufkleben mit Wasser eben so sehr wie von dem mit Eiweiss. (S. hierzu § 187 die Methode von Apáthy.) Alles in Allem genommen, darf man also das Aufkleben mit Wasser, da es unzweifelhaft weniger leicht und rasch geht wie das mit Eiweiss, Schellack etc., nur dann empfehlen, wenn es auf gut gestreckte Schnitte ankommt, oder wenn das Eiweiss sich mitfärben würde.

Nusbaum (Anat. Anzeiger 12. Bd. 1896 p. 52) klebt mit Brunnenwasser (oder destill. Wasser mit einer Spur Gummi arabicum) auf. — Albrecht & Stoerk (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 12) lassen die Schnitte auf dem Objektträger im kalten Wasser sich durch Anhauchen strecken, pressen sie dann mit glattem Filtrirpapier kräftig an, lösen sofort das Paraffin durch Xylol auf, verdrängen dieses durch absoluten Alkohol und giessen eine Lösung von Celloidin auf, die aber so dünn sein muss, dass man hinterher das Häutchen von Celloidin nicht merkt. — Nicht weniger energisch verfährt Eisen (ibid. 14. Bd. 1897 p. 197). Er benutzt zum Aufkleben Alkohol von 80%, bedeckt die Schnitte aber, nachdem sie sich in der Wärme gestreckt haben, mit Fliesspapier, rollt einen metallenen Stab „with considerable force“ über sie hin und bürstet sie zuletzt mit einem weichen Pinsel ab. Diese heroischen Mittel sollen nicht schaden.

185. Eiweiss. Nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 4. Bd. 1883 p. 521; Internation. Monatschr. Anat. Phys. 4. Bd. 1887 p. 42) werden Eiweiss und Glycerin je 50 ccm und Natriumsalicylat 1 g gut gemischt und in eine ganz reine Flasche filtrirt. Das Filtriren dauert Tage lang, aber das Gemisch verdirbt dabei nicht.

Lee (Vade-Mecum 5. Edit. 1900 p. 143) löst das Natriumsalicylat in etwas Wasser, setzt dies dem Eiweiss zu und schlägt es erst tüchtig, bevor er das Glycerin hinzufügt.

Man streicht auf den kalten Objektträger ein klein wenig von obigem Eiweiss auf, verreibt es gut mit dem vorher sauber abgewischten Finger, legt die Schnitte auf — falls sie es vertragen, mag man sie mit dem Pinsel sanft andrücken — und erwärmt nun den Objektträger einige Minuten auf dem Wasserbade. Uebrigens genügt es auch, den Objektträger nur einen Augenblick durch eine Flamme zu ziehen, sodass das Paraffin ordentlich schmilzt. Nachher wird dieses auf die gewöhnliche Weise mit Xylol, Chloroform etc. aus den Schnitten entfernt. Man darf aber, wenn die Schnitte nicht gefärbt werden sollen, nicht etwa direkt Balsam darauf geben, denn das Glycerin würde ja darunter bleiben und Trübungen verursachen, vielmehr müssen die Schnitte unter allen Umständen auch in absoluten Alkohol und von hier entweder in die Färbgemische oder zurück in Xylol, Benzol etc. Das Glycerin hat allerdings nur den Zweck, das Eiweiss vor dem Eintrocknen auf dem Objektträger zu schützen, ist aber gerade deswegen unentbehrlich.

Grandis (Atti Accad. Lincei Rend. (4) Vol. 6 1890 Sem. 2 p. 138; Arch. Ital. Biol. Tome 14 1891 p. 412) zeigt, dass sich Eiweiss in Kontakt mit der gleichen Menge Glycerin beim Kochen sehr rasch, aber auch bei gewöhnlicher Temperatur zersetzt. Der dabei gebildete Körper koagulirt nicht mehr durch Hitze, ist jedoch in Alkohol unlöslich. In Mayers Gemisch war schon nach 2 Monaten das meiste Eiweiss zersetzt, nach 2 Jahren aber alles.

In der That ist es auch nicht geradezu nothwendig, den Objektträger zu erwärmen, obwohl Mayer auf seine Methode nur durch den Gedanken an die Koagulation des Eiweisses gekommen war, und frisches Eiweissglycerin ohne Zweifel noch koagulirt. Aber indem das Paraffin schmilzt, legen sich die Schnitte glatter auf, als wenn man es durch kaltes Xylol etc. fortschafft, und insofern ist die Erwärmung doch anzurathen.

Die Schnitte haften sowohl in alkoholischen als auch in wässerigen Flüssigkeiten absolut sicher, soweit nicht diese das Eiweiss lösen (z. B. Alkalien), und daher ist die Methode für Schnitte, die noch gefärbt werden sollen, warm zu empfehlen; noch dazu arbeitet man sehr rasch mit ihr. Sie hat aber mit der von Schällibaum und von

Giesbrecht das gemein, dass sie gefaltete Schnitte nicht glättet, gerollte nicht streckt. Auch färbt sich das Eiweiss unter Umständen etwas mit (bei reinen Kernfärbungen nicht!), indessen wird dies nur selten eine Störung hervorrufen. Worin aber bei der Anwendung der Methode am ehesten gefehlt wird, ist, dass man gern viel zu viel Eiweiss unterstreicht; man verreibe es also gut mit dem Finger und wische dann womöglich noch mit dem Ballen der Hand über den Objektträger hin; damit man hierbei nicht etwa seine eigenen Epithelzellen auf das Glas befördere, reibe man zuvor Finger und Ballen auf einem Tuche ab.

Es scheint vorzukommen, dass das Eiweissgemisch nach einiger Zeit trübe wird und verdirbt. Vosseler (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1891 p. 457) macht darauf aufmerksam, dass es mit der Zeit dunkler und dünnflüssig werde und dann nicht mehr gut klebe; man möge es daher alle 6 Monate neu bereiten.

Beide erwähnten Nachtheile habe ich (Mayer) selbst an dem ältesten von mir verfertigten Gemische nicht erlebt; es ist jetzt 17 Jahre alt und bildet eine hellbraune Gallerte, klebt aber nach wie vor gut. Vielleicht hat man das Natriumsalicylat nicht in der richtigen Menge genommen, oder das Eiweiss war nicht mehr frisch.

186. Wasser und Eiweiss. Die möglichen Kombinationen beider Methoden des Aufklebens mit Wasser und mit Eiweiss scheinen nachgerade alle verwirklicht zu sein, aber von Zeit zu Zeit wieder neu entdeckt zu werden. Bei einigen von ihnen bereitet das Eiweiss wohl nur den Objektträger zur glatten Aufnahme des Wassers vor und hilft beim Kleben kaum mit (s. oben p. 125).

Duval (Journ. Anat. Phys. Paris Tome 27 1891 p. 26) legt die Schnitte trocken auf den Objektträger, lässt stark verdünntes Eiweiss darunter fliessen, erwärmt ihn bis zum Glattwerden der Schnitte und legt ihn auf 24 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur zum Trocknen hin. — Henneguy (ibid. p. 398) breitet auf dem mit Eiweiss bestrichenen Objektträger mit einem Glasstabe etwas Wasser aus, legt die Schnitte auf und trocknet sie nach der Glättung in 10—15 Minuten bei 40° C. Aehnlich verfährt Ohlmacher (*Journ. Amer. Med. Ass. April 1893). — Mann (Anat. Anzeiger 8. Jahrg. 1893 p. 442; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 486) schüttelt Eiweiss mit dem 10fachen Volumen an Wasser 5 Minuten lang, filtrirt es zweimal durch dasselbe Filtrirpapier und bestreicht damit einen Vorrath von Objektträgern, die er dann trocknen lässt. Die Schnitte lässt er sich auf Wasser von 40° C. ausbreiten, hebt sie mit einem dieser Objektträger heraus, ordnet sie darauf, lässt das Wasser ablaufen, legt ihn zum Trocknen 5 Minuten lang in einen Wärmofen von 35° C. und entfernt endlich das Paraffin mit Xylol.

Apáthy (Mikrotechnik p. 126) braucht Eiweissglycerin in 100facher Verdünnung mit Wasser. — Sobotta (Anat. Hefte 1. Abth. 8. Bd. 1897 p. 477) findet das Aufkleben nur mit Wasser nicht zuverlässig bei Präparaten aus Chromsäuregemischen oder für osmirtes Fett; er bestreicht daher den Objekt-

träger vorher ganz dünn mit Eiweissglycerin. — Die sogenannte Japanische Aufklebmethode, die REINKE (Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 21) dem Japaner Ikeda zuschreibt, ist die von Henneguy.

187. Wasser, Eiweiss und Celloidin. APÁTHY (Carazzi, Manuale p. 114) klebt sehr schwierige Schnitte oder solche, die hinterher lange mit Säuren, Alkalien etc. behandelt werden sollen, folgendermassen auf. Zuerst wird auf dem Objektträger mit verdünntem Eiweiss (1 Theil auf 4 Th. einer $^1/_2$ %igen Lösung von Formol und zur Färbung etwas Fuchsin) ein Rahmen von der Grösse des Deckglases gezogen und durch Hitze koagulirt. Die Schnitte werden innerhalb des Rahmens mit Wasser aufgeklebt und nach dem Trocknen mit einer 2 %igen Lösung von Celloidin äusserst dünn (mit einem weichen breiten Pinsel) in der Art bestrichen, dass auch der Rahmen davon bedeckt ist. Sie werden dann wie gewöhnlich weiter behandelt, nur ist der absolute Alkohol durch 95 %igen zu ersetzen (aus diesem kommt das Präparat bei der Ueberführung in Balsam erst in ein Gemisch gleicher Theile von absol. Alk. und Chloroform, dann in reines Chloroform), auch vollziehen sich alle Proceduren durch das Celloidin hindurch etwas langsamer als sonst. Der Rahmen kann übrigens auch nach dem Festkleben und Trocknen der Schnitte gezogen werden. Für Celloidinschnitte ist die Methode ebenfalls brauchbar.

188. Schellack. Nach GIESBRECHT (Z. Anzeiger 4. Jahrg. 1881 p. 484) bestreicht man die erwärmten Objektträger ganz dünn und möglichst gleichmässig mit einer nicht zu konzentrirten, filtrirten Lösung von Schellack in absolutem Alkohol, indem man in diese einen ziemlich dicken Glasstab taucht und ihn rasch über das Glas der Länge nach hinführt. Die Objektträger bewahrt man trocken auf; unmittelbar vor dem Gebrauch streicht man ein wenig Kreosot mit einem Pinsel ganz dünn darüber, legt die Schnitte auf und lässt im Wasserbade das Paraffin schmelzen und das Kreosot verdunsten. Nach dem Abkühlen wird das Paraffin mit Terpentinöl, das den Schellack nicht auflöst, weggeschafft und das Präparat in Kanadabalsam eingeschlossen.

Diese älteste aller Aufklebemethoden hat später einige Abänderungen erfahren (s. darüber die vorige Auflage dieses Buches p. 117), die aber das Prinzip nicht berühren. Sie ist dann fast ganz in Vergessenheit gerathen, aber nach mir (MAYER) mit Unrecht. Allerdings für Schnitte, die man färben will, eignet sie sich nicht, aber für solche, die nicht weiter behandelt, auch nicht erst geglättet, sondern direkt in Harz eingeschlossen werden sollen, kenne ich keine bequemere. Zudem ist sie völlig zuverlässig, denn die damit aufgeklebten Schnitte können mehrere Tage lang senkrecht in Xylol stehen, ohne sich loszulösen. Alles, was man zu thun hat, ist: man überstreicht den gut erwärmten Objektträger mit Schellack, lässt ihn erkalten, legt die Schnitte darauf, drückt sie, wenn sie stark gefaltet oder gerollt sind, mit dem Pinsel sanft an, erwärmt in der Flamme bis zum Schmelzen des Paraffins und kann nun sofort Xylol darauf geben und in Xylolbalsam (oder Dammar) einschliessen. Das ganze Geheimniss dabei ist dieses: man verschaffe sich einen Schellack, der nach dem Erkalten auf dem Objektträger, wenn man den Finger darauf presst, nur einen ganz schwachen Eindruck davon bekommt. Ist er weicher, so kleben die Schnitte

nicht recht fest, ist er härter, so thun sie es ebenfalls nicht, aber dann kann man durch Bestreichen mit Nelkenöl helfen. Ob er braun oder gebleicht ist, thut Nichts zur Sache. Die Lösung mache man in absolutem Alkohol (vom braunen im Verhältniss von 1 : 20, vom gebleichten 1 : 5), lasse absetzen, filtrire, lasse nochmals einige Tage gut absetzen und prüfe ihn dann sowohl mit dem Finger, als auch, indem man Schnitte, wie oben angegeben, damit festklebt und in Xylol aufstellt.

Da Chloroform ebenfalls den Schellack löst, so darf der Balsam nicht damit verdünnt sein, wohl jedoch mit Terpentinöl, Benzol oder Xylol.

189. Kollodium. Nach Schällibaum (Arch. Mikr. Anat. 22. Bd. 1883 p. 565) streicht man von dem klaren Gemisch von 1 Vol. Kollodium und 3—4 Vol. Nelkenöl (oder Lavendelöl) ein wenig mit einem Pinsel auf den Objektträger, legt die Schnitte auf und erwärmt ihn 5—10 Minuten lang auf dem Wasserbade, bis das Oel verdunstet ist. Die Schnitte haften fest und können bis ins Wasser gebracht werden, ohne sich abzulösen; auch färben sollen sie sich lassen: ich (Lee) finde aber nicht, dass sie dafür sicher genug aufgeklebt sind und kann die Methode höchstens für schon gefärbte Schnitte empfehlen. Auch eignet sie sich nicht zum Strecken und Glätten der Schnitte.

Nach Rabl (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 170) hingegen, der 3 Theile Nelkenöl auf 2 Theile Kollodium nimmt, muss man sich zwar alle 4—5 Tage diese Mischung frisch bereiten, und das Nelkenöl darf auch nicht lange am Licht gestanden haben. Aber bei dieser Vorsicht wird man keinen Schnitt verlieren, selbst nicht beim Färben in wässerigen Lösungen.

Field & Martin (Bull. Soc. Z. France 19. Vol. 1894 p. 48) meinen, Xylol, Toluol oder Benzol mache das Kollodium leichter löslich in Alkohol, und brauchen daher zum Lösen des Paraffins Petroläther.

Gallemaerts (*Bull. Soc. Belge Micr. Vol. 15 1889 p. 56; Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 493) verwendet unter Anlehnung an Drasch eine konzentrirte Lösung von Schiessbaumwolle in Aceton, die er mit absolutem Alkohol so weit wie nöthig verdünnt hat. — Gage (Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 4 1884 p. 654) überzieht die Objektträger mit Kollodium, lässt sie trocknen und bepinselt sie erst beim Gebrauch mit Nelkenöl. Aehnlich Summers (Amer. Month. Micr. Journ. Vol. 8 1887 p. 73; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 482); er legt aber die Schnitte trocken auf und lässt dann ein Gemisch von Alkohol und Aether zu gleichen Theilen darunter fliessen; sowie dieses verdunstet ist, haften die Schnitte fest. — Ich (Mayer) löse die Schiessbaumwolle direkt in Nelkenöl, halte übrigens die ganze Methode für wenigstens entbehrlich.

Strasser (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 45) empfiehlt ein Gemisch von 2 Theilen Kollodium, 2 Theilen Aether und 3 Theilen Rizinusöl, oder (ibid. 6. Bd. 1880 p. 153) 2 Theilen Kollodium und 1 Theil Rizinusöl; die aufgelegten Schnitte werden mit einem dickeren Gemisch (2—3 Theile Kollodium duplex und 2 Theile Rizinusöl) überstrichen, und der Objektträger wird dann ohne vorherige Erwärmung bis zur Lösung des Paraffins, d. h. auf 2—10 Stunden (in der Wärme etwas kürzere Zeit) in Terpentinöl gebracht. Dieses härtet das Kollodium (Benzol und Chloroform thun das auch). — S. auch Gebhardt in: Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 39 (Kombination der Methode von Strasser

mit dem Aufkleben durch Wasser) und BLOCHMANN (ibid. p. 189: Aufkleben mit Wasser auf Kollodiumhäute).

190. Kollodium-Papier. Die Methode von STRASSER (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 346) ist eine sehr komplizirte Abänderung der von Weigert für Celloidinschnitte (§ 201) und nur mit dem Mikrotom von Strasser zu gebrauchen. Näheres in: Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 346; 6. Bd. 1889 p. 154; 7. Bd. 1890 p. 290, 304; 9. Bd. 1892 p. 8; 12. Bd. 1895 p. 154; 14. Bd. 1897 p. 39.

191. Gummi arabicum. Nach FLÖGEL (Z. Anzeiger 6. Jahrg. 1883 p. 565) wird 1 Theil Gummi in 20 Theilen Wasser gelöst, filtrirt und gegen das Schimmeln mit etwas Alkohol versetzt. Der Objektträger wird hiermit bestrichen, getrocknet und nach dem Auflegen der Schnitte angehaucht, um das Gummi klebrig zu machen; oder die Schnitte, namentlich grosse, kommen direkt auf den noch feuchten Objektträger. Dann wird das Paraffin aufgelöst und Balsam auf die Schnitte gegeben.

FRENZEL (Arch. Mikr. Anat. 25. Bd. 1885 p. 51) setzt zu einer dünnen Lösung von Gummi in Wasser eine wässerige Lösung von Chromalaun, etwas Glycerin und Alkohol (l. c. p. 142). Hiermit wird der Objektträger wie gewöhnlich bestrichen, die Schnitte werden mit dem Pinsel sanft darauf angedrückt, dann angeschmolzen und höchstens 15 Minuten lang auf 30—45° C. erwärmt, um das Gummi unlöslich zu machen, sodass die Schnitte nachher auch in Wasser festhalten. Das Gummi soll sich auch in den meisten Färbgemischen nicht mitfärben, wohl aber in Fuchsin und Safranin.

Nach WADDINGTON (Journ. Quekett Micr. Club Vol. 6 1881 p. 199; Journ. R. Micr. Sc. London (2) Vol. 1 1881 p. 704) reinigt man Gummi, indem man die filtrirte Lösung in viel Alkohol giesst, das ausgefällte „Arabin" mit Alkohol auf dem Filter gut wäscht, trocknet, wieder in Wasser löst und zweimal filtrirt.

192. Quittenschleim. BORN & WIEGER (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 346) nehmen 2 Theile offizinellen Quittenschleim, 1 Theil Glycerin und eine Spur Karbolsäure. — VAN WALSEM (Verh. Akad. Amsterdam (2) 7. Deel No. 1 1899 p. 149) braucht selbst bereiteten Quittenschleim.

Agar-Agar. GRAVIS (Bull. Soc. Belge Micr. Vol. 15 1889 p. 72; Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 494) verwendet 1 Theil Agar in 1000 Theilen Wasser gelöst.

193. Gelatine. PERRIER (Ann. Sc. N. (7) Tome 8 1890 p. 77) streckt die gefärbten Schnitte mit einer 2—3%igen, sorgfältig filtrirten Lösung von Gelatine auf dem Objektträger und klebt sie auch damit fest. Nachfärben lassen sie sich nur mit Farbstoffen (z. B. Methylenblau), die in absol. Alkohol oder gar in einem Gemisch von diesem und Nelkenöl gelöst sind; man muss auch ja darauf achten, dass die Gelatine sich nicht mitfärbt. — Aehnlich BÜRGER (Fauna Flora Golf. Neapel 22. Monogr. 1895 p. 446); er bestreicht aber den Objektträger vorher noch mit Eiweissglycerin und konstatirt, dass die Schnitte in Alkohol von weniger als 70% nicht mehr haften.

Aeusserst komplizirt verfährt VAN WALSEM (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 229).

Gray (*The Microscope Vol. 9 1889 p. 325; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1890 p. 117) macht die Gelatine hinterher durch eine 2 %ige wässerige Lösung von Kaliumbichromat unlöslich. — Henneguy (Leçons sur la cellule. Paris 1896 p. 62) nimmt Gelatinelösung 1:5000 und setzt beim Gebrauch eine Spur Bichromat zu; den Objektträger mit den Schnitten trocknet er dann am Licht 2—3 Stunden lang. — Alleger (Proc. Amer. Micr. Soc. Vol. 15 1894 p. 192) macht die ½ %ige Gelatinelösung durch Zusatz von etwas Formol unlöslich: die Färbung der Schnitte wird dadurch nicht beeinträchtigt. — Aehnlich Eisen (Proc. Californ. Acad. Sc. Vol. 5 1895 p. 4; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1895 p. 486) und Koniński (Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1898 p. 161), der seine Methode als neu hinstellt.

194. Ueber die Methode von Obregia mit **Zucker und Photoxylin** s. unten § 202.

195. Guttapercha. (Frenzel in: Z. Anzeiger 6. Jahrg. 1883 p. 51 u. 423) und **Kautschuk** (Threlfall ibid. p. 301). Beides komplizirte und nicht ganz zuverlässige Methoden, auch jetzt kaum noch im Gebrauch. S. jedoch die ebenfalls sehr umständliche Verwendung der Guttapercha durch van Walsem (Verh. Akad. Amsterdam (2) 7. Deel No. 1 1899 p. 153) für grosse Hirnschnitte sowie die Benutzung von Traumaticin (Guttapercha in Chloroform) durch Vosmaer & Pekelharing (ibid. 6. Deel No. 3 1898 p. 43) für Schnitte durch unentkieselte Kieselschwämme.

Methoden für Schnitte, die nicht entwässert werden sollen.

196. Gelatine und Chromalaun. Fol (Lehrbuch p. 132) löst 4 g Gelatine unter stetem Umrühren auf dem Wasserbade in 20 ccm Eisessig und gibt zu 5 ccm der Lösung 70 ccm Alkohol von 70 % und 1—2 ccm einer 5 %igen wässerigen Lösung von Chromalaun. Diese Mischung giesst er auf die Objektträger und lässt sie trocknen. In einigen Stunden wird die Gelatine unlöslich, quillt aber in Wasser noch auf und wird dann klebrig. Man taucht daher den Objektträger in das Wasser, worin die Schnitte schwimmen, bringt diese darauf und nimmt den Objektträger wieder heraus; sie haften dann fest. Besonders für Schnitte durch Objekte in Gummi oder Seife, aber auch für Zupfpräparate und Celloidinschnitte.

Methoden für Celloidinschnitte.

197. Eiweissglycerin. Wie ich (Lee) aus eigener Erfahrung weiss, lassen sich auch Celloidinschnitte mit Eiweissglycerin aufkleben; man muss sie nur recht sorgfältig darauf andrücken. Das Celloidin kann man hinterher ruhig mit Aether und Alkohol auflösen. —

S. auch JORDAN (Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1898 p. 54) und ARGUTINSKY (Arch. Mikr. Anat. 55. Bd. 1900 p. 417).

198. Aetherdämpfe. SUMMERS (Amer. Month. Micr. Journ. Vol. 8 1887 p. 73; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 482) legt die Schnitte auf 1—2 Minuten in Alkohol von 95 %, ordnet sie dann auf dem Objektträger an und überfluthet sie aus einer halbvollen Flasche mit den Dämpfen von Aether. Das Celloidin wird sofort weich und ganz durchsichtig. Den Objektträger legt er darauf in 80 % igen oder sogar direkt in 95 % igen Alkohol. Die Schnitte sollen ganz fest kleben und sich färben lassen. Ich (LEE) habe die Methode nicht sicher befunden. — SCHIEFFERDECKER (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 507) räth an, wenn man die Schnitte färben will, die Objektträger vorher mit einer Schicht Kollodium versehen zu haben; sonst aber genüge ein reiner Objektträger. Die Behandlung mit Aetherdämpfen kann auch in einem Glase oder sonstwie geschehen. — Nach GAGE (Proc. Amer. Micr. Soc. Vol. 14 1892 p. 82) überzieht man die Objektträger vorher mit einer 1/2 % igen Lösung von Eiweiss und lässt sie trocknen; das Kollodium haftet dann fester. — S. auch die Methode von Apáthy (§ 199).

AUBURTIN (Anat. Anzeiger 13. Bd. 1897 p. 90) lässt um das Objekt möglichst wenig Celloidin stehen, schneidet in 70 % igem Alkohol, entfernt diesen von den Schnitten auf dem Objektträger vorsichtig zuerst mit Fliesspapier, dann durch absoluten Alkohol und giesst nun reichlich Aether und Alkohol auf, damit sich das Celloidin ganz von den Schnitten löse und bei der Verdunstung auf dem Objektträger als dünne Membran niederschlage. Dann Alkohol von 70 %, Wasser, Färblösung etc.

199. Bergamottöl. Auch APÁTHY (Mitth. Z. Stat. Neapel 7. Bd. 1887 p. 745; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 46; ibid. 6. Bd. 1889 p. 167) benutzt die Aetherdämpfe zum Aufkleben, lässt aber zuvor die Schnitte sich auf Bergamottöl strecken und zugleich den Alkohol verlieren.

Das Messer bestreicht man vor dem Schneiden mit Vaselin (s. oben p. 113) und benetzt es dann mit 95 % igem Alkohol. Die Schnitte bringt man aber sofort auf Bergamottöl, das grün sein, nicht nach Terpentinöl riechen und mit 90 % igem Alkohol vollkommen mischbar sein muss (s. § 115). Sie breiten sich auf dem Oel ganz aus; bevor sie aber untersinken, zieht man sie mit einer Nadel einen nach dem anderen an ihren Platz auf ein Stück Pauspapier, das in das Oel eintaucht. (Das Papier schneidet man sich etwa so breit wie den Objektträger und dreimal so lang wie das Deckglas.) Ist die richtige Anzahl Schnitte auf dem Papier, so hebt man es aus dem Oel, lässt dieses ablaufen,

trocknet die andere Seite des Papieres auf Fliesspapier, legt es dann mit den Schnitten auf den ganz trockenen Objektträger und drückt es mit Fliesspapier darauf an. Rollt man es nun langsam auf, so bleiben die Schnitte auf dem Glase und werden mit einem Streifen glatten Löschpapieres, den man darüber legt und andrückt, vom überschüssigen Bergamottöl befreit. Sind sie schon gefärbt, so legt man sie direkt in Balsam ein, sollen sie aber erst noch gefärbt werden, so setzt man sie nach Entfernung des Bergamottöls den Dämpfen von Alkohol und Aether einige Minuten lang aus, bringt sie auf 1/4 Stunde in Alkohol von 90% und kann sie nun ohne Gefahr in Gemischen färben, die 70%igen oder stärkeren Alkohol enthalten. Müssen sie dagegen in wässerige Flüssigkeiten, so sind die Schnitte auf dem Papier so zu ordnen, dass das Celloidin an den Rändern sich deckt, damit sie durch den Aetherdampf alle zu einer einzigen Membran zusammenkleben. Diese löst sich dann im Wasser vom Glase ab und kann nun wie ein einziger grosser Schnitt weiter behandelt werden.

Sind die Objekte sehr klein oder ungefärbt, so gibt man zum Bergamottöl ein wenig Safranin in Alkohol gelöst; so färbt sich das Celloidin der Schnitte in wenigen Sekunden und ist dann besser sichtbar. Nach dem Einlegen in Balsam verschwindet diese Farbe in einigen Tagen wieder.

Später hat Apáthy selber diese Methode dahin verändert, dass er (Mikrotechnik 1896 p. 127 und 176) die Objektträger mit einer dünnen Celloidinschicht überzogen vorräthig hält und die Schnitte direkt aus dem Bergamottöl auf sie hinauf zieht und dort mit Fliesspapier andrückt.

200. Celloidin. Auch bei dieser Methode fettet Apáthy (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 168) das Messer mit dem Finger tüchtig, aber gleichmässig mit gelbem Vaselin ein und benetzt es mit Alkohol von 70—90%. Jeder Schnitt wird sofort mit einer Nadel oder einem kleinen Pinsel auf eine trockene Stelle des Messers geschoben, und hier werden sie nun in Reihen geordnet, wobei sie sich mit ihren Rändern wenigstens berühren müssen, noch besser aber übereinander greifen. Sobald ein Raum von der Grösse des Deckglases voll ist (oder auch mehrere solche Räume), trocknet man die Schnitte durch Auflegen von Filtrirpapier ab (sie können daran nicht festkleben, weil sie auf dem Vaselin liegen) und bepinselt sie mit der schwächsten Celloidinlösung, wie sie zum Durchtränken gebraucht wird (s. oben § 160), lässt sie zum Verdunsten 5 Minuten lang liegen und benetzt sie nun mit Alkohol von 70%, damit man ruhig weiter schneiden kann, oder legt sie, wenn man nicht mehr schneiden will oder das Messer ganz voll ist, sammt dem Messer in Alkohol von 70%. Dieser härtet das Celloidin zu einer einzigen Membran, die man mit einem Skalpell leicht vom Messer wegnehmen und nach Belieben weiter

behandeln kann. Am besten legt man sie aber gleich auf den Objektträger, klebt sie darauf an den Rändern mit Aether und Alkohol fest und bringt sie in das Färbgemisch. S. auch oben § 187.

201. Kollodium. Nach WEIGERT (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 490) benetzt man beim Schneiden das Messer mit Alkohol, jedoch nicht so sehr, dass der Schnitt schwimmt. Dann tränkt man einen Streifen Klosetpapier (porös aber zäh) von etwa der doppelten Breite des Schnittes mit Alkohol, fasst ihn an beiden Enden, streckt ihn etwas und lässt ihn auf den Schnitt hinunter; dieser klebt gleich daran und kann so über die Schneide hin heruntergezogen werden. Den 1. Schnitt nimmt man mit dem Ende des Papieres auf, das man mit der linken Hand hält, und lässt die anderen sich von links nach rechts daran reihen. Jedesmal nach dem Aufheben eines Schnittes legt man, um weiter schneiden zu können, das Papier auf einen Pack von mehreren Lagen Filtrirpapier, der mit Klosetpapier bedeckt, mit Alkohol durchtränkt ist und in einer Schale liegt. Sind alle Schnitte glücklich auf dem Papier, so beginnt das Ueberziehen mit Kollodium.

Zunächst werden die Schnitte auf eine Glasplatte (für wenige oder kleine Schnitte ist das ein Objektträger) übertragen, die man vorher, wie es die Photographen thun, mit einer dünnen Schicht Kollodium überzogen hat. (Solche Platten kann man vorräthig halten.) Man legt das Papier umgekehrt darauf, sodass die Schnitte auf das Kollodium kommen, drückt es sanft glatt an und nimmt es sorgfältig ab; die Schnitte haften auf dem Kollodium. Man bringe aber höchstens zwei Reihen Schnitte auf die Platte, damit sie nicht trocken werden, bevor mehr dazu kommen, sondern nehme gleich mit Fliesspapier allen Alkohol von den Schnitten fort, giesse Kollodium darüber und lasse es sich zu einer ebenen Schicht ausbreiten. Nun darf man die Platte unter 80%igem Alkohol bei Seite legen oder gleich färben. In wässerigen Färbgemischen lösen sich beide Kollodiumblätter vom Glase los, halten aber die Schnitte zwischen sich fest und lassen sich bequem färben, auswaschen, entwässern und in Balsam bringen, nur darf man keinen stärkeren Alkohol als 96%igen verwenden. WEIGERT empfiehlt (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 480) als Intermedium das im § 168 angegebene Gemisch. Natürlich dauern alle Prozesse wegen des Kollodiummantels länger als bei freien Schnitten.

Man schneidet sich von der Schnittreihe die richtige Länge für das Einlegen in Balsam zurecht, solange sie noch in Alkohol ist, oder noch besser man bringt sie zum Zerschneiden eigens auf Klosetpapier, das voll Alkohol ist.

STRASSER meint, gummirtes Papier sei besser als die Glasplatten, besonders bei sehr grossen Schnitten; s. oben § 190.

WINTERSTEINER (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 316) reiht die Schnitte nicht erst lange auf dem Papier auf, sondern lässt sie vom Messer direkt auf die Glasplatte gleiten.

202. Zucker und Photoxylin. Nach OBREGIA (Neur. Centralbl. 9. Jahrg. 1890 p. 295; in etwas anderer Form bei GULLAND in: *Journ. Path. London 1893) überzieht man Objektträger oder grössere Glasplatten mit einem Gemisch von 3 Maasstheilen Zuckersyrup, 2 Theilen Alkohol von 95% und 1 Theil Dextrin-

syrup (muss durchsichtig sein) und lässt sie 2—3 Tage zum Trocknen liegen, bis sie, mit dem feuchten Finger berührt, gerade noch kleben. (Das Dextrin verhindert den Zucker am Kristallisiren.) Die Paraffinschnitte werden darauf gelegt und 10 Minuten lang auf 57—60° erwärmt; dann wird die Platte in Xylol (oder Terpentinöl), von da auf einige Minuten in absoluten Alkohol gebracht und, nachdem man diesen hat abtropfen lassen, mit 3%iger Photoxylinlösung übergossen. Nach 10 Minuten wird sie in Wasser getaucht, worin sich die Photoxylinhaut mit den Schnitten bald vom Glase ablöst. Die Celloidinschnitte hingegen bringt man zunächst auf ein Blatt satinirtes Seidenpapier, das, mit der satinirten Seite nach oben, in einer Schale liegt und darin mit 95%igem Alkohol feucht gehalten wird, glättet und ordnet sie darauf, nimmt dann das Papier aus der Schale, legt es zuerst einen Augenblick auf Filtrirpapier, dann umgekehrt auf den vorbereiteten Objektträger, drückt es mit Fliesspapier leicht an, zieht es langsam ab und übergiesst nun die festgeklebten Schnitte mit einer 3%igen Lösung von Photoxylin. Zuletzt lässt man diese an der Luft erhärten und löst sie durch Untertauchen in Wasser als eine zusammenhangende Platte vom Glase ab.

Die Methode von Obregia hat den Vortheil, dass sie auf alle Arten Schnitte, auch auf solche aus gar nicht eingebettetem Material, anwendbar ist.

Dimmer (Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd. 1899 p. 44) nimmt zum Ueberziehen der Objektträger eine Lösung von Gelatine in Wasser (etwa 1 : 20) und trocknet sie 2 Tage lang. S. übrigens oben § 193 (Allegeb) und § 196.

---

10. Kapitel.

Allgemeines über das Färben.

203. Arten der Färbungen. Man kann die Färbungen eintheilen in diffuse, wo alle Elemente eines Objektes, und in spezifische oder elektive, wo nur einzelne Elemente durch Färbung hervorgehoben, die übrigen aber entweder gar nicht oder weniger stark oder in einem anderen Ton tingirt sind. Während aber eine diffuse Färbung nur selten brauchbar ist (s. unten), bestrebt man sich in der Regel, durch elektive Färbung eine optische Differenzirung zu erreichen.

Diese Differenzirung kann eine histologische sein: dann tritt durch Färbung ein ganzes Gewebe oder eine Gruppe von Gewebelementen hervor, und der Rest des Präparates bleibt farblos oder ist wenigstens anders gefärbt, z. B. bei einer gut gelungenen Färbung der Nervenenden mit Goldchlorid. (Diese Art der Färbung bezeichnet man gewöhnlich als spezifisch.) Sie kann aber auch eine cytologische sein: dann färben sich z. B. entweder nur die Zellkerne oder nur einer der übrigen Bestandtheile aller Zellen im Präparate.

Die Färbungen, die durch eine besondere Affinität der Farbstoffe zur Substanz der Zellkerne zu Stande kommen, die Kernfärbungen, sind einstweilen noch für den Zoologen die wichtigsten. Denn dieser will meist nicht so sehr wie der Histologe den feineren Bau der Zellen färberisch differenziren, um diese an und für sich zu studiren, sondern er will die Zellkerne durch ihre Farbe in dem ungefärbten Gewebe so hervorgehoben sehen, dass sie ihm gewissermaassen als Marken zum bequemen und raschen Auffinden der Zellen dienen; die übrigen Theile der Zellen aber lässt er absichtlich ungefärbt, damit sie möglichst wenig Licht absorbiren. Vielleicht ist das irrationell, aber bisher hat es sich als ungemein förderlich für allgemeine Arbeiten bewährt.

Es gibt aber noch eine andere Gruppe von elektiven Färbungen, nämlich die Plasmafärbungen. Diese betreffen speziell gewisse

Theile des Zellplasmas (Gerüstwerk, Granula, Polkörper etc.) und lassen meist die Kerne unberührt. Man unterscheidet daher 1. diffuse Färbungen, 2. elektive Färbungen, und zwar a) Kernfärbungen, b) Plasmafärbungen, c) histologisch elektive oder spezifische Färbungen.

Von der diffusen Färbung ist nur noch wenig die Rede. Absichtlich wird sie kaum irgendwo angewandt, am ehesten noch, wenn man auf einem Schnitte die Hohlräume oder Lücken in den Geweben besonders deutlich sehen will, oder für homogene Membranen (Chitin, Celloidin etc.). Unabsichtlich erhalten aber gilt sie mit Recht als verwerflich.

Ehrlich & Lazarus (Anämie 1. Abth. Wien 1898 p. 23) klassifiziren die Färbmethoden nach ihrem Zweck in solche, die nur Uebersichtsbilder liefern sollen, ferner solche, die nur eine spezifische Zellart charakteristisch hervorheben — singuläre Färbung — und solche, die möglichst viele Elemente in möglichst verschiedenen Farben zeigen — panoptische Färbung.

204. Methoden zum Färben. Bei der idealen Art des elektiven Färbens müssten offenbar die Elemente, die man zu tingiren vorhat, genau so viel Farbstoff an sich binden, wie man wünscht, sodass nach dem rein mechanischen Auswaschen der Färblösung aus den Interstitien des Objektes mit Hülfe desselben Mittels, worin der Farbstoff gelöst ist (also meist des Wassers oder Alkohols), diese Elemente gleich in der richtigen Intensität gefärbt zurückblieben. Färblösungen, die solches leisten, sind leider selten bequem herstellbar, obwohl man es z. B. in der Regel beim Hämalaun erreichen kann, dass dieses fast ausschliesslich die Kerne tingirt und auch bei noch so langem Färben nicht überfärbt; und durch geeignete Zusätze (etwas mehr Alaun als gewöhnlich, eine ganz schwache Säure etc.) wird man wahrscheinlich selbst in schwierigen Fällen das ideale Ziel erreichen.

Bei dieser Art der Färbung lässt sich noch am ehesten die Ansicht vertreten, dass das Resultat auf einer chemischen Bindung des Farbstoffs durch das Gewebe beruht (s. unten § 208). Meist jedoch verfährt man in der Praxis theils aus Bequemlichkeit, theils weil keine andere Möglichkeit vorzuliegen scheint, nach zwei anderen Methoden.

Nach der einen — der progressiven oder direkten — verwendet man eine Färblösung, die das hervorzuhebende Element rascher färbt als die anderen, die man ungefärbt haben möchte; man unterbricht also den Prozess und fixirt durch Auswaschen der Färblösung die Farbe in dem Element, sobald dieses stark genug gefärbt ist, der Rest hingegen gar keine oder doch nur wenig Farbe angenommen

hat. Dies geschieht z. B., wenn man die Kerne mit einem ganz schwachen Hämateïnthonerde-Gemisch färbt: in einem bestimmten Moment hat man eine ziemlich reine Kernfärbung erzielt, lässt man aber das Gemisch noch länger einwirken, so färben sich auch die übrigen Bestandtheile der Zelle, und dann ist es um die elektive Färbung geschehen.

Die andere Methode — die regressive oder indirekte — beruht darauf, dass man überfärbt und dann theilweise entfärbt. Man tingirt also zuerst das ganze Objekt diffus und schafft darauf die Farbe überall da fort, wo sie nicht bleiben soll, während die Elemente, die man zu färben wünscht, die Farbe hartnäckiger festhalten. Dies geschieht z. B. beim Färben mit Safranin: zunächst ist das ganze Präparat tief roth, wäscht man es aber einige Sekunden lang mit Alkohol aus, so bleibt die Farbe nur in den Kernen erhalten. Hauptsächlich durch die Einführung der Theerfarbstoffe in die Mikrotechnik ist diese Methode zu relativ grosser Vollkommenheit entwickelt worden. Genaueres s. unten § 269 ff.

Ausser in der geschilderten Art lassen sich aber die Methoden noch von zwei anderen Gesichtspunkten aus klassifiziren: 1) je nachdem man die Objekte direkt in die Färblösung bringt oder sie noch vorher zur Erzielung besonderer Farbeffekte mit Chemikalien (Beizen) behandelt, kann man zwischen substantiver und adjektiver Färbung unterscheiden (Genaueres in § 207); 2) von rein praktischen Erwägungen geht aus und ist deshalb nicht minder wichtig die Unterscheidung in Stückfärbung und Schnittfärbung.

Bei der Stückfärbung (s. auch oben p. 7 und unten § 210) verfährt man theils in einer dem Ideal angenäherten Weise (z. B. beim Durchfärben mit Hämalaun, das in der Regel nicht überfärbt), theils progressiv (bei anderen Hämateïngemischen, wo ein Ueberfärben zu befürchten steht), theils regressiv (beim Boraxkarmin, wo man erst hinterher durch Auswaschen mit saurem Alkohol die elektive Färbung der Kerne zu Stande bringt). Auch die adjektive Färbung mit Beizen wird hier nicht selten vorgenommen, allerdings nur für ganz spezielle Zwecke (einige Methoden von Weigert etc.).

Noch bunter geht es bei der Schnittfärbung zu. Hier darf man sogar in ganz idealer Weise dem Schnitt von der natürlich dazu passenden Färblösung gerade nur so viel darbieten, dass er den genannten Farbstoff elektiv an sich bindet — dies ist z. B. eine der

ältesten Arten der Karminfärbung; ferner kann man rein progressiv färben, obwohl das nur selten geschieht; besonders aber färbt man regressiv, und zwar ebenso wohl unter Benutzung von Beizen (z. B. mit Eisensalzen und Hämatoxylin) als auch ohne diese. Endlich kommt hier die Doppel- oder überhaupt Mehrfachfärbung zu ihrem Recht.

Bei dieser handelt es sich meist um die Hervorhebung gewisser Theile des Zellplasmas (Körnchen aller Art etc.) vor anderen und um das hierdurch bewirkte leichte Auffinden gewisser Arten von Zellen (Erythrocyten, Becherzellen etc.) in den Schnitten. Dabei werden die Kerne färberisch entweder ganz vernachlässigt oder durch Stückfärbung tingirt, und erst hinterher färbt man auf den Schnitten die weiteren Einzelheiten nach, dann allerdings gewöhnlich rein progressiv. Oder aber man bietet — wieder in idealer Weise — dem Schnitte ein Gemisch von mehreren Farbstoffen zur Auswahl dar, aus dem nun die Kerne den einen, die Theile des Zellplasmas den oder die anderen entweder rein oder in Mischtönen an sich binden. Leider sind gerade die schönsten Färbungen dieser Art nicht recht dauerhaft.

Eine besondere Art von Doppelfärbung erhält man bei der Benutzung der sogenannten metachromatischen Farbstoffe. Dieser Farbenumschlag (nach Ehrlich Metachromasie) rührt in manchen Fällen von Verunreinigungen der Farbstoffe her, z. B. des Methylgrüns mit Methylviolett, ist in anderen dagegen wohl rein optischer Natur. Genaueres s. unten § 801.

205. Zustand der Gewebe vor dem Färben. In der Regel lassen sich scharfe Färbungen nur an sorgfältig fixirten Geweben erzielen. Todte, aber nicht eigens fixirte Gewebe färben sich allerdings, gewöhnlich aber nicht scharf; und lebendes Gewebe färbt sich in der Regel überhaupt nicht, sondern widersteht den Farbstoffen so lange, bis es dadurch getödtet ist (Ausnahmen s. im nächsten §).

Wahrscheinlich kommen die gewöhnlichen Färbungen fixirter Gewebe auf zweierlei Art zu Stande. Entweder resultiren sie aus der Verbindung des Farbstoffes mit organischen oder anorganischen Salzen, z. B. Phosphaten, die im lebenden Gewebe enthalten waren und nun vom Fixir- oder Härtemittel in situ niedergeschlagen werden (s. Mayer in: Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 17); dies scheint der Fall zu sein, wenn man mit Alkohol fixirt. Oder sie resultiren aus der Verbindung des Farbstoffes mit gewissen

chemischen Körpern, die im lebenden Gewebe nicht existirten, sondern sich erst bei der Konservirung aus den Bestandtheilen des Fixirmittels und denen des Gewebes bildeten; dies scheint z. B. vom Fixiren mit Chromsäure zu gelten, und die Verbindungen sind wohl hauptsächlich Metall-Albuminate. S. auch § 207.

Lange Aufbewahrung fixirter Objekte in Alkohol ist im Allgemeinen der Färbung hinderlich; hierauf macht neuerdings wieder CORNING (Morph. Jahrb. 27. Bd. 1899 p. 174) aufmerksam.

206. Färben intra vitam. Einige Farbstoffe haben die Eigenschaft, lebende Zellen zu tingiren, ohne sie erheblich zu schädigen. Hierher gehören Cyanin (Chinolinblau), Methylenblau, Toluidinblau, Thionin, Bismarckbraun, Anilinschwarz, Neutralroth, Congoroth, Auramin, ferner unter gewissen Bedingungen Dahlia, Eosin, Gentianaviolett, vielleicht auch Methylviolett und andere. S. hierüber bei den genannten Farbstoffen, sowie bei MARTINOTTI (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 305) und FISCHEL (Anat. Hefte 1. Abth. 11. Bd. 1899 p. 467). S. auch § 882.

Die meisten von diesen Farbstoffen dürfen nur äusserst verdünnt angewandt werden und nur in neutralen oder schwach alkalischen Flüssigkeiten, denn Säuren wirken ja giftig. Bei richtigem Gebrauch nun färben sie thatsächlich Manches im Zellplasma intra vitam, jedoch wohl nie das Chromatin der Kerne; denn wenn sie dies färben, so ist das ein Zeichen des Todes. Die Farbe ist mitunter im ganzen Zellplasma diffus verbreitet, meist aber beschränkt sie sich auf allerlei Arten von Körnchen oder anderen Substanzen darin.

Nach BETHE (Biol. Centralbl. 15. Bd. 1895 p. 140) färben sich mit Methylenblau auch Kerne in den lebenden Zellen der Ruderplättchen von Ctenophoren. — S. auch PRZESMYCKI (ibid. 17. Bd. 1897 p. 321 und in: Sitzungsb. Ges. Morph. Phys. München 15. Bd. 1899 p. 70).

Nach MAXIMOW (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1899 p. 67) färben sich beim Tingiren frischen embryonalen Blutes mit Körnchen von Neutralroth die Kerne beim Absterben sehr deutlich. — PICTON (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 41 1898 p. 296) hat eine ganz schwache Färbung der Zellkerne von Polychäten, die eine Woche lang in Seewasser mit Karminpulver darin gelebt hatten, gefunden, aber nur auf den sonst ungefärbten Schnitten durch die mit Alkohol fixirten Würmer. — Nach LOISEL, der lebende Poriferen mit allerlei Farbstoffen gefüttert hat (Journ. Anat. Phys. 34. Année 1898 p. 198 u. 205), färbt sich der Kern noch im Leben mit Neutralroth, Nilblau, Methylenblau und Congoroth zwar so echt, dass die Färbung selbst in den fertigen Präparaten erhalten bleibt,

aber ganz diffus. Und in einer kleinen lebenden Meduse waren von den Ektodermzellen mit Methylenblau nur die Kerne gefärbt (p. 227). — Nach Pantel (La Cellule Tome 15 1898 p. 79) färbt Methylenblau intravital bei der Larve von *Thrixion* im Kern nur den Nucleolus.

Ich (Lee) habe selber viele Beobachtungen über die intravitale Färbung gemacht und bin dabei zu demselben Schlusse gelangt wie Galeotti (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 204), nämlich dass die Färbungen intra vitam oft keine echten Färbungen sind. Die oben erwähnte diffuse Farbe beruht, wenn die Zelle noch bei vollem Leben ist, offenbar nicht auf einer chemischen Verbindung des Farbstoffes mit irgend einem Bestandtheile der Zelle. Wenn nämlich eine so gefärbte Zelle in ein ungefärbtes Medium gebracht wird, so gibt sie die Farbe unverändert wieder ab; dies aber scheint doch zu beweisen, dass die Farbe nur mechanisch in den Interstitien der Zellsubstanz festgehalten worden war. Die stärkere Färbung der Granula oder anderer Bestandtheile der Zelle mag zwar mitunter eine echte Färbung sein; jedenfalls aber sind diese Färbungen unweigerlich an Körper gebunden, die keinen integrirenden Theil der lebenden Zelle ausmachen: die Zelle selbst mag am Leben sein, sie sind es nicht. Es sind wohl Nahrungstheilchen, die von aussen aufgenommen worden sind, oder Produkte des Stoffwechsels, die bald ausgestossen werden sollen; oder wenn sie wirklich einen integrirenden Theil des lebenden Gewebes ausmachen, so haben sie wohl von der eindringenden Färblösung gelitten und sind deswegen oder aus anderen Gründen in ihrer Vitalität geschwächt, nie aber bestehen sie aus noch ganz lebenskräftiger Materie.

Auch ich (Mayer) habe bei meinen Versuchen mit Bismarckbraun an Caprelliden (Fauna Flora Golf. Neapel 6. Mon. 1882 p. 153) und später an Selachiern nie die geringste Färbung der Kerne bemerkt, sondern nur die der Sekretballen und anderer todten Substanzen im Zellplasma. S. auch Michaelis (Arch. Mikr. Anat. 55. Bd. 1900 p. 560) und Plato (ibid. 56. Bd. 1900 p. 868), sowie § 882.

Nach Overton (Jahrb. Wiss. Bot. 34. Bd. 1900 p. 669) kommt die intravitale Färbung dadurch zu Stande, dass das Cholesterin oder Lecithin die basischen Theerfarbstoffe aus wässerigen Lösungen begierig aufnimmt. Speziell beruht die Färbung des Nervensystems mit Methylenblau wohl auf dessen hohem Gehalte an den beiden genannten Stoffen (p. 692). In allen Zellen sind die Plasmahäute mit diesen imprägnirt (p. 699).

Abgesehen übrigens von der Frage, ob die sich färbenden Theilchen leben oder nicht, so muss man doch zugeben, dass die

Färbung intra vitam oft recht nützlich wird. Denn sie ermöglicht es uns, Zustände oder Elemente in den Geweben optisch zu differenziren, die man sonst am lebenden Objekte gar nicht oder nicht leicht erkennen könnte.

Das Methylenblau lässt sich in den Geweben nach den Methoden fixiren, die im Kap. 15 angegeben sind, und liefert dann haltbare Präparate. Aehnlich nach Harris das Toluidinblau. Bismarckbraun fixirt man mit Chromsäure (0,2 %) oder Sublimat (Mayer) oder 1 %iger Osmiumsäure (Loisel l. c. p. 212) und kann hinterher noch mit Safranin färben, darf aber den Alkohol nicht lange auf das Präparat einwirken lassen.

Man kann auch mehrere Farbstoffe zugleich auf die lebenden Gewebe einwirken lassen, z. B. Methylenblau und Neutralroth (Ehrlich & Lazarus, Anämie 1. Abth. Wien 1898 p. 85; Loisel, l. c. p. 219) und erhält dann meist keine Mischfarben, sondern sieht die Granula je nach ihrer Art den einen oder den anderen Farbstoff aufnehmen.

Israel & Pappenheim (Arch. Path. Anat. 143. Bd. 1896 p. 426) lösen das Neutralroth nicht vorher in Wasser, sondern setzen es dem Blut als feinste Körnchen zu.

207. Substantive und adjektive Farbstoffe; Beizen. Die technische Färberei unterscheidet zwei Klassen von Farbstoffen je nach ihrem Verhalten zu den Geweben: die Farbstoffe, die aus ihren Lösungen von der Wolle, Baumwolle, Seide etc. direkt aufgenommen werden, heissen substantive oder direkte, die anderen hingegen, die sich mit Gewebe nur dann verbinden, wenn es vorher mit einer Beize (gewöhnlich einem Metallsalz oder einem -hydrat) behandelt worden ist, heissen adjektive oder Beizenfarbstoffe.

Die thierischen Gewebe haben in der Regel eine beträchtliche Affinität zu den Farbstoffen und nehmen sie direkt aus den Lösungen auf. Daher färbt man meist substantiv. Immerhin sind (s. § 205) wahrscheinlich viele Färbungen, die man ohne absichtliches Beizen der Gewebe erzielt, genau genommen doch adjektiv. Und zwar wird das allemal der Fall sein, wenn man zu der Annahme Grund hat, dass die Färbung das Resultat einer Verbindung des Farbstoffes mit einem Metallsalze oder -hydrat ist, das dem lebenden Gewebe nicht inhärirt, sondern ihm erst beim Fixiren oder Härten einverleibt wird, wobei denn die Fixir- oder Härtmittel als Beizen thätig sein würden, obwohl man sie nicht als solche hatte verwenden wollen. Dies mag auf alle oder wenigstens auf einige Färbungen

zutreffen, die sich nach Fixirung mit den Salzen von Quecksilber, Eisen, Platin, Palladium, Uran und bedingungsweise auch von Chrom ergeben. Auch Jod und Kaliumhypermanganat spielen bei einigen Färbungen eine Rolle, die sich wohl nur durch die Annahme, sie wirken als Beize, erklären lässt.

Mitunter werden aber Beizen absichtlich angewandt, um die Farbe zu produziren. So z. B. bei den Methoden von Benda und Heidenhain mit Hämatoxylin-Eisen (§ 260) und von Rawitz mit Theerfarbstoffen (§ 277). Dabei ergiebt sich indessen in der Regel zunächst eine ganz diffuse Färbung, sogar Ueberfärbung aller Bestandtheile des Objektes, und man erlangt daher erst durch vorsichtige Entfernung des sogar in den Interstitien der Gewebe niedergeschlagenen Farbstoffes überhaupt eine brauchbare Färbung. Offenbar ist diese regressive Art der Beizfärbung von der idealen, wie sie oben p. 138 geschildert ist, himmelweit entfernt und muss daher als höchst gefährlich für den Anfänger hingestellt werden, da sie ihn leicht zu falschen Schlüssen von den oft sehr frappanten Bildern im Mikroskope auf den Zustand der Gewebe im Leben verleitet. S. unter Anderem Boveris (Zellenstudien 4. Heft Jena 1900 p. 12 ff.) Kritik der Färbung mit Eisenhämatoxylin, wo besonders die Bilder der Centrosomen bei der „konzentrischen Entfärbung" durch den Eisenalaun näher erörtert werden; ebenso bei Fischer (Fixirung etc. p. 118 etc.) die „Spiegelfärbung".

Rawitz (Leitfaden 2. Aufl. 1895 p. 55 ff.; Anat. Anzeiger 13. Bd. 1897 p. 75 ff.) ist gegen die Eintheilung der Färbmethoden in progressive und regressive, um so mehr aber für die in substantive und adjektive. Indessen hat Mayer bereits (ibid. p. 314) darauf hingewiesen, dass beide Arten der Klassifikation willkürlich seien, und zugleich vor dem Missbrauche mit den Ausdrücken Beize und Farblack gewarnt. Vor Kurzem hat er (Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd. 1899 p. 196) über die Beziehungen zwischen Beizen und Farbstoffen etwa Folgendes ausgeführt.

Beide stehen nicht in schroffem Gegensatze zu einander, sondern ergänzen sich, und je nach Umständen kann die Beize zum Farbstoffe werden, und umgekehrt. Durchtränkt man z. B. ein Gewebe erst mit einer Lösung von Alaun und bringt es nachher in eine Lösung von Karminsäure, so hat man es mit jenem gebeizt und mit dieser gefärbt. In der That ist die Färbung ganz anders ausgefallen, als sie der „Farbstoff" Karminsäure allein hervorgebracht hätte. Man kann aber ebenso gut mit Karminsäure durchtränken (beizen) und mit Alaun die Färbung hervorrufen (färben); es würde sich daher wohl empfehlen, vom Vorbehandeln statt vom Beizen zu reden. Auch braucht hiernach ein Farbstoff nicht selber gefärbt zu sein und noch weniger genau die Farbe zu haben, die er sogar nach Behandlung mit einer farblosen Beize dem farblosen Gewebe

ertheilt; so ist z. B. eine Lösung von Hämatëin braun und färbt doch das Gewebe, wenn dieses ausserdem Thonerde aufzunehmen Gelegenheit findet, violett. — S. auch BENDA in: Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1900 p. 175.

208. Theorie der Färbung. Von jeher, seitdem man sich mit Spekulationen über die Theorie der Färbung abgegeben hat, ist man uneinig darüber, ob es sich beim Färben um chemische oder um physikalische Prozesse handelt. Dass letztere dabei eine Rolle spielen, ist selbstverständlich, da ja die Färblösungen in die Gewebe eindringen und wieder daraus entfernt werden müssen. Die Frage ist also nur die: beruht die Bindung der Farbstoffe durch die Elemente der Gewebe auf einem chemischen oder einem physikalischen Vorgange? Für Jenes sind unter Anderen Ehrlich, Unna, Mayer und Benda eingetreten, für Dieses Gierke, Rawitz und ganz besonders Fischer. Eine eingehende Behandlung der strittigen Punkte würde hier aber zu weit führen, und so sei nur auf die wesentliche neuere Literatur verwiesen.

FISCHER (Fixirung etc. p. 73—201); Kritik Fischers von BENDA (Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1900 p. 174); WITT (Färber-Zeitung Berlin 1890/91 Heft 1); speziell über Kernfärbung: MAYER (Anat. Anzeiger 13. Bd. 1897 p. 313); MATHEWS (Amer. Journ. Phys. Vol. 1 p. 445).

209. Wahl der Farbstoffe. Folgende Färbgemische mögen dem Anfänger empfohlen werden.

Für Schnitte Hämalaun oder speziell nach Konservirung mit Chromosmiumgemischen Eisenhämatoxylin.

Für ganze Objekte alkoholisches Boraxkarmin, Karmalaun oder Hämalaun; es sei denn, das Objekt verlange wegen seiner Undurchlässigkeit ein stark alkoholisches Gemisch, und dann verwende man Parakarmin oder nach Fixirung mit Chromsäure Hämacalcium.

Für frische Gewebe oder kleine ganze Objekte Methylgrün, wenn die Präparate sich nicht zu halten brauchen, sonst Karmalaun oder Alaunkarmin (diese beiden geben bei Seethieren leicht Präzipitate von Gips). Zur Doppelfärbung in toto dient nach Karmin- oder Hämateïngemischen Pikrinsäure. Indessen möge der Anfänger lieber nicht gleich doppelt färben, wo eine einzige Farbe genügt.

Ueber die Haltbarkeit der Färbungen s. unten § 279.

210. Praxis der Stückfärbung. Obwohl sich ganze Objekte unter Umständen direkt aus dem Fixirgemisch oder nach Auswaschen des-

selben mit Wasser ohne Schaden in das Färbgemisch übertragen lassen, so fällt doch in der Regel die Färbung weit besser aus, wenn sie vorher mit Alkohol behandelt worden sind (s. auch oben p. 7). Ist nun das Färbgemisch selber alkoholisch, so bringt man die Objekte direkt hinein, ist es aber wässerig, so ist es meist gut, mitunter aber sogar nöthig, sie sich erst mit schwächerem Alkohol durchtränken zu lassen. So bilden sich z. B. beim Färben mit Hämalaun und anderen Gemischen, die viel Alaun enthalten, wenn man die Objekte direkt aus starkem Alkohol hineinbringt, leicht in oder auf ihnen Kristalle von Alaun. Ebenso muss man beim Auswaschen verfahren, sonst überträgt man leicht Kristalle oder Niederschläge aus den Färbgemischen mit in die eingebetteten Stücke und wird sie beim Schneiden oder in den fertigen Präparaten zu seinem Leidwesen darin vorfinden.

Wie lange die Objekte im Färbgemisch und später in der Waschflüssigkeit bleiben müssen, hängt in erster Linie von ihrer Durchdringlichkeit ab. Mitunter sind Tage nöthig, und man hat bei der Wahl des Gemisches hierauf Rücksicht zu nehmen, damit nicht etwa die Gewebe inzwischen maceriren. Das kann z. B. leicht bei Pikrokarmin, aber auch bei Boraxkarmin vorkommen.

Man muss stets reichliche Mengen des Färbgemisches anwenden, weniger damit die Objekte genug Farbstoff vorfinden (denn dieser ist nicht so leicht erschöpft), als damit die aus ihnen austretende Flüssigkeit nicht etwa die Zusammensetzung des Gemisches wesentlich ändere. Ferner sind die Objekte so zu legen (eventuell auf eine poröse, aber sonst unschädliche Unterlage) oder aufzuhängen, dass sie von allen Seiten leicht durchtränkt werden können.

Fixiren und Färben zugleich ist nur ganz ausnahmsweise möglich, wenigstens wenn man brauchbare Resultate erzielen will. Es gelingt mit Essigsäure und Methylgrün (§ 281), allenfalls auch noch mit Essigsäurekarmin (§ 223). In thörichter Weise hat es Perényi (Z. Anzeiger 5. Jahrg. 1882 p. 459) ausgeübt. Ich (Mayer) finde, dass man zwar zur Noth Hämalaun verwenden kann, rathe aber selber davon ab.

211. Praxis der Schnittfärbung. Hierüber lassen sich noch weniger allgemeine Regeln geben als über das Färben in toto.

Einen wesentlichen Unterschied macht es zunächst, ob man lose Schnitte (oder, was ihnen gleich kommt, Stücke dünner Membranen) oder aufgeklebte Schnitte zu färben hat. Jene sind zwar in der Regel rascher färbbar, da sie ja auch ihre Unterseite der Flüssigkeit

frei darbieten, aber dafür um so schwieriger zu behandeln, es sei denn, sie seien in Celloidin eingebettet. Manchmal gerathen übrigens die Färbungen besser, wenn das Celloidin vorher durch Alkohol und Aether fortgeschafft worden ist; auch färbt es sich zuweilen bedenklich stark mit.

Ferner sind die Diffusionströme beim Ueberführen der Schnitte aus starkem Alkohol in schwachen oder Wasser (und umgekehrt) natürlich den Schnitten viel gefährlicher als ganzen kompakten Objekten. GAGE (Trans. Amer. Micr. Soc. Vol. 17 1896 p. 367) will sie vermeiden, indem er die Schnitte direkt aus 95 $^0/_0$ igem Alkohol in Wasser (und umgekehrt) bringt. Ich (MAYER) habe mich von der Richtigkeit dieser Angabe nicht überzeugt und schalte daher immer noch wenigstens 70 $^0/_0$ igen Alkohol ein.

Lose Schnitte färbt man wohl stets in Gefässen (Uhrschälchen etc.), die aufgeklebten entweder in Tuben (s. oben p. 7) oder, indem man das Färbgemisch auf die liegenden Objektträger bringt. Letztere Methode ist, wo sie überhaupt zulässig ist (der ausgedehnte Kontakt der dünnen Flüssigkeitschicht mit der Luft kann schädlich wirken), obwohl weniger bequem, doch deswegen vorzuziehen, weil man nachher ja in der Regel die paar Tropfen des Gemisches fortgiesst, daher immer mit frischen Mengen arbeitet, während in den Tuben allmählich das Gemisch nicht nur schwächer an Farbstoff wird, sondern auch aus den Schnitten Stoffe aufnehmen kann, die es ändern. Operirt man geschickt, so kann man sogar auf demselben Objektträger einen Theil der Schnitte anders färben als den Rest, etwa indem man erst alle mit einem Kernfärbemittel behandelt und hinterher in einem Theil das Plasma noch besonders tingirt.

Ueber Mayers Methode des Färbens von Paraffinschnitten vor dem Wegschaffen des Paraffins s. oben p. 7.

Bei Doppel- oder Mehrfachfärbungen tingirt man in der Regel zuerst die Kerne und dann die Theile des Plasmas, die man hervorzuheben sucht (z. B. erst Hämalaun, dann Eosin), seltener umgekehrt; mitunter jedoch genügt eine einzige Operation, wie z. B. mit dem Triacidgemisch von Ehrlich.

Obwohl natürlich ceteris paribus sich Schnitte viel rascher färben als ganze Objekte, so hängt doch die absolute Zeitdauer sehr von der Art des Färbgemisches und sonstigen Umständen ab, zum Theil auch von der persönlichen Liebhaberei. Während nämlich die Einen lieber einen ganzen Tag und länger färben — so lässt z. B. RAWITZ (Leitfaden 2. Aufl. 1895 p. 57) 24 Stunden nur „in den meisten Fällen“ genügen — richten sich Andere die Färbgemische so her, dass gewöhnlich wenige Minuten oder sogar Sekunden hin-

reichen. Jene behaupten, die schwachen Gemische ergäben diskretere Färbungen, scheuen auch bei den starken Gemischen die eher mögliche Ueberfärbung und wollen nicht mit der Uhr in der Hand die kurzen Zeiten abmessen. Im Allgemeinen ist aber rasches Färben schon deswegen vorzuziehen, weil dabei namentlich in wässerigen Gemischen (und nun gar in Pikrokarmin etc.) die Schnitte weniger leiden werden.

212. Bezug der Farbstoffe. Man hat nicht leicht Erfolg beim Färben, wenn man nicht für gute Farbstoffe sorgt. Und diese lassen sich nicht mit Sicherheit dadurch erlangen, dass man sie von einer im Allgemeinen renommirten Handlung mit Chemikalien bezieht. Denn es genügt nicht, dass sie das leisten, was man im Handel von ihnen verlangt; sie mögen rein sein und brauchen doch nicht gut zu färben. Sondern sie müssen identisch mit denen sein, die der Autor benutzt hat, der sie empfiehlt und über ihre Wirkung berichtet. Ganz besonders gilt alles dies von den Theerfarbstoffen (z. B. Safranin, s. § 285). Ich (Lee) rathe daher, wenigstens alle irgendwie feineren Farbstoffe von Grübler & Hollborn in Leipzig oder G. Münder in Göttingen zu beziehen. Grübler hat sie alle vorräthig und liefert nur solche, von denen er sicher weiss, dass sie in der gewünschten Weise färben. Er bereitet ferner die Fixir- und Färbgemische, Injektions- und Einbettmassen etc. nach den bewährten Formeln und versendet sie gebrauchfertig. Aus eigener Erfahrung kann ich seine Präparate warm empfehlen, denn in 9 unter 10 Fällen sind sie besser, als man sie sich selber machen wird.

Derselben Meinung bin ich (Mayer) und erkenne bei dieser Gelegenheit gern die Bereitwilligkeit der Firma Grübler & Hollborn an, die oft recht speziellen Fragen und Wünsche der Forscher sorgfältig zu erledigen. Ueber Münder habe ich keine eigenen Erfahrungen.

11. Kapitel.

Färben mit Karmin, Karminsäure und Cochenille.

213. Karmin. Nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1892 p. 480; Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd. 1899 p. 215) hat man früher irrige Vorstellungen über das Färben mit Karmin gehegt, da man glaubte, Karmin sei Karminsäure mit einigen Verunreinigungen. Indessen ist das unrichtig, denn nach Liebermann (Ber. D. Chem. Ges. 18. Jahrg. 1886 p. 1969) ist Karmin eine Verbindung von Karminsäure mit Thonerde, Kalk und Eiweisskörpern, eine echte chemische Verbindung, worin Thonerde und Kalk ebenso wenig fehlen dürfen, wie das Natrium im Kochsalz. Ein sehr gutes Karmin enthielt etwa 17 % Wasser, 20 % stickstoffhaltige Substanzen, 56 % Karminsäure und reichlich je 3 % Thonerde und Kalk. Mayer kommt zu dem Schlusse, dass beim histologischen Färben (nicht beim technischen) ausser der Karminsäure stets die Thonerde, manchmal auch der Kalk eine Rolle spielen. Die Proteïnsubstanzen im Karmin sind, soweit sie überhaupt einen Einfluss ausüben, wohl eher schädlich, da sie zu der wohlbekannten Fäulniss der Lösungen Veranlassung geben.

Auf Grund dieser Ergebnisse war es natürlich, wenn man statt des Karmins die Karminsäure zum Ausgangspunkt für die Färblösungen nahm. Dies hatte schon Dimmock (Amer. Natural. Vol. 18 1884 p. 324) gethan, indessen ohne Erfolg, da sich in seinen Gemischen der zweite wichtige Faktor, die Thonerde, nicht vertreten fand; er färbte nur mit reiner Karminsäure oder deren Ammoniaksalz und erhielt daher nur schwache und diffuse Färbungen, Mayer hingegen suchte nach geeigneten Mitteln zur Einführung der Thonerde in die Lösungen; seine Resultate siehe im folgenden §.

Die Einzelheiten der Bereitung des Karmins sind das Geheimniss der Fabrikanten; was davon in den technologischen Werken steht, beruht allermeist auf Irrthum, wenn nicht gar auf absichtlicher Irreführung durch jene.

Löslich ist gutes Karmin in destill. Wasser nur sehr wenig, leicht dagegen bei Zusatz von kaustischen und kohlensauren Alkalien oder von Borax, weniger leicht und theilweise nur unter Zersetzung in Lösungen von Alaun, Aluminiumchlorid (oder -nitrat), sowie in Essigsäure und Mineralsäuren. In Alkohol nur bei Gegenwart von Säure (besonders Salzsäure).

Zum Färben von thierischen Geweben hat es zuerst CORTI (Zeit. Wiss. Z. 3. Bd. 1851 p. 153 etc.) gebraucht, für Pflanzen zuerst Hartig; die allgemeine Verwendung datirt von Gerlach (1858). S. hierüber Genaueres bei APÁTHY (Mikrotechnik p. 92).

214. Karminsäure (C_{22} H_{22} O_{18}?). Chemisch rein, wie vor Kurzem von Schunck & Marchlewski dargestellt, ist sie im Handel noch nicht zu haben, dürfte auch für praktische Zwecke zu theuer sein. Aber annähernd rein, in mikroskopisch kleinen Kristallen liefert sie C. A. F. Kahlbaum in Berlin, und gut, obwohl amorph, hat sie auch Grübler & Hollborn. (Gewöhnlich ist sie rothbraun und scheint sich dann, besonders in der Wärme, leicht derart zu verändern, dass sie dunkler wird, zerfliesst und sich nicht mehr klar löst.) In Wasser und schwächeren Alkoholen muss sie leicht und klar löslich sein; beim Glühen auf dem Platinblech darf sie keine Asche hinterlassen. Es ist eine dreibasische Säure, die aus Marmor die Kohlensäure austreibt und mit den Alkalimetallen lösliche, mit den Erd- und Schwermetallen hingegen unlösliche Verbindungen liefert, über die noch wenig Genaues bekannt ist. Das Thonerdesalz, das Aluminiumkarminat, ist in Wasser oder schwachem Alkohol löslich bei Gegenwart von Säuren und sauren Salzen, aber auch von Alkalien und basischen Salzen, wie Borax. Man erhält es durch Fällen einer Lösung von Karminsäure (oder Ammoniumkarminat) durch Aluminiumacetat, ferner, aber nur theilweise, durch Chloraluminium, nicht hingegen durch Alaun, da sich das entstehende Aluminiumkarminat sofort wieder auflöst, sodass die zum Färben geeignete Lösung, das **Karmalaun** (§ 217), zu Stande kommt.

Fällt man die Karminsäure, wie eben erwähnt, mit Chloraluminium aus und setzt dann mehr von letzterem hinzu, so löst sich der Niederschlag wieder auf, und es resultirt eine Lösung, die man zum Färben nehmen mag, wenn man Alaun aus irgend einem Grunde zu vermeiden wünscht (s. § 218). Diese und das Karmalaun färben übrigens violett, etwa wie Alaunkarmin. Fügt man nun Chlorcalcium zum Karmalaun, so wird sofort der Ton der gefärbten Objekte lebhafter roth; nur bildet sich zugleich durch Umsetzung Calciumsulfat, das

unlöslich ist. Daher ist es richtiger, man fügt das Chlorcalcium zu dem Chloraluminium; in der That erhält man ein gutes Gemisch, das **Parakarmin** (§ 233).

Vergleicht man die obigen Auseinandersetzungen über das Färben mit Karminsäure mit denen über das Färben mit Hämatoxylin, wie sie im nächsten Kapitel gegeben werden sollen, so findet man eine interessante Parallele: in beiden Prozessen ist nicht der Farbstoff an sich thätig, sondern in Verbindung mit Thonerde; die Farbe resultirt in dem einen Falle aus Karminsäure + Thonerde, in dem anderen aus Hämateïn + Thonerde, während andere Substanzen, z. B. Kalk, nur gelegentlich dabei eine Rolle spielen.

In der Mikrotechnik wird die Karminsäure bisher nur in Verbindung mit Aluminium, Calcium, Eisen, Kalium und Natrium benutzt; man geht dabei entweder direkt von ihr aus oder bedient sich als Zwischenstufe des Karmins. Das sogenannte karminsaure Ammoniak und karminsaure Natron, die zum Injiziren in die Leibeshöhle oder Gefässe von Thieren, aber auch zum Färben dienen, sind nicht diese Salze, sondern lockere Verbindungen des Karmins mit Ammoniak und Soda, heissen daher auch richtig Ammoniak- und Sodakarmin. — S. im Uebrigen Mayer in: Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd. 1899 p. 212.

215. Cochenille. Nach Mayer, dessen frühere Untersuchungen durch seine neuesten (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1892 p. 496) bestätigt werden, ist in dem Auszug aus Cochenille, wie er histologisch verwandt wird, keine freie Karminsäure, sondern ein karminsaures Alkali vorhanden. Der wässerige Auszug mit Alaun (Alauncochenille, § 222) verdankt seine Färbkraft dem Aluminiumkarminat (s. oben § 214). Der Auszug mit Alkohol allein enthält dagegen nur das karminsaure Alkali und färbt daher nur schwach und diffus, wie die Karminsäure selbst. Trifft er aber in den Geweben mit Salzen von Kalk, Magnesia, Thonerde und Metallen zusammen, die damit gefärbte Niederschläge bilden, so kann daraus eine starke und elektive Färbung resultiren. In der That gibt Mayers einfache Cochenilletinktur (§ 235) mit Objekten, die solche Salze enthalten, schöne Erfolge. Leider sind aber derartige Objekte ziemlich selten, und daher liefert die Cochenilletinktur meist sehr schwache Färbungen. Setzt man dagegen zur Tinktur von vorne herein die nöthigen Salze, so muss sie ohne Weiteres bei jeder Art von Objekten eine starke elektive Färbung ergeben; dies ist denn auch der Fall (§ 236).

Cochenille besteht aus den getrockneten ♀ von *Coccus cacti;* etwa 150000 sollen auf ein Kilo gehen. Nach Liebermann enthält eine gute Cochenille 9—10, eine sehr gute 14% Farbstoff. Im Thiere ist dieser nach Mayer (l. c. p. 506) nur im Fettkörper und im Dotter der Eier enthalten.

216. Allgemeines über die Anwendung der Karmingemische. Für frische Gewebe eignen sie sich mit Ausnahme des Essigsäurekarmins nicht. Für Schnitte ebenfalls nicht besonders, denn in der Regel färbt man diese mit Theerfarbstoffen oder mit Hämateïngemischen besser als mit Karmingemischen. Dagegen sind sie für ganze Thiere, überhaupt für Stückfärbung sehr zu empfehlen, besonders wenn es dabei nicht auf feinere cytologische Einzelheiten ankommt.

Dem Anfänger seien vor Allem Boraxkarmin (§ 231) und Karmalaun (§ 217) empfohlen, da diese am leichtesten zu behandeln sind. — Für Objekte, die schlechterdings kein Wasser oder keinen schwachen Alkohol vertragen, ist Parakarmin ein gutes Färbmittel. — Sehr präzise Kernfärbung gibt mit Alaunlösung verdünntes Karmalaun oder auch Alaunkarmin (§ 219). — Als Farbstoff für das Plasma eignet sich in allen diesen Fällen Pikrinsäure, die man aber am bequemsten erst auf dem Schnitte unmittelbar vor dem Einschluss in Balsam wirken lässt. Nur in ganz seltenen Fällen verwendet man noch zum Färben der Kerne und des Plasmas irgend ein Pikrokarmin (§ 228).

Ueberfärbungen lassen sich meist mit Alaunlösung, stets aber mit schwach saurem Alkohol (etwa $^1/_{10}$% Salzsäure) auswaschen. Nach HENNEGUY (Journ. Anat. Phys. Paris 27. Année 1891 p. 400) soll dazu Kaliumhypermanganat brauchbar sein, aber dies dürfte eher die Färbung ganz und gar vernichten, als sie differenziren. — Alle Arten von Karminfärbung halten sich in Balsam, nur die mit Essigsäurekarmin nicht; die mit Karmalaun, Alaunkarmin etc. bleiben auch in Glycerin gut. Man darf aber natürlich keins von den sauren Gemischen oder den Grenacherschen Lösungen nehmen, falls die Gewebe kalkige Elemente enthalten, die man unversehrt lassen möchte, es sei denn, man wendete es ganz verdünnt an.

Im Folgenden sind die Gemische nach ihrer Zusammensetzung (ob wässerig oder alkoholisch, und in ersterem Falle, ob sauer oder basisch) angeordnet. Dabei sind viele ältere, die mit Recht nicht mehr gebraucht werden, nur noch angeführt worden.

A. Wässerige Gemische.

a) Saure.

217. Karmalaun. MAYER (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1891 p. 489) löst 1 g Karminsäure und 10 g Alaun warm (oder auch bei gewöhnlicher Temperatur) in 200 ccm destillirtem Wasser, lässt ab-

setzen und giesst ab oder filtrirt, setzt auch ein Antiseptikum zu (am besten 1 ccm Formol oder $^1/_5$ g Salicylsäure oder 1 g Natriumsalicylat). Die Lösung ist haltbar; sie ist roth mit einem Stich ins Violette und färbt selbst die mit Osmium konservirten Objekte durch. Wäscht man hinterher bloss mit Wasser aus, so behält das Plasma etwas Farbe zurück; will man also eine ganz reine Kernfärbung haben, so nehme man zum Auswaschen Alaunlösung (und dann muss man diese später wieder mit Wasser fortschaffen) oder in hartnäckigen Fällen eine schwache Säure. Der allgemeine Effekt ist der einer Färbung mit Alaunkarmin (§ 219); jedoch färbt letzteres im Allgemeinen nicht gut durch, Karmalaun hingegen wohl.

Die Objekte, die mit Karmalaun (gewöhnlichem oder schwachem) gefärbt werden sollen, dürfen nicht alkalisch reagiren.

Eine Lösung, die dem Alaunkarmin von Grenacher nahe kommt und nur etwas rother färbt, erhält man aus 1 Theil Karminsäre, 30—50 Alaun und 1000 Wasser (ebenfalls mit einem Antiseptikum).

Ueber ein etwas rotheres Karmalaun s. unten § 219.

Rawitz (Anat. Anzeiger 15. Bd. 1899 p. 438) bereitet ein Glycerin-Karmalaun aus 1 g Karminsäure, 10 g Ammoniakalaun, 75 ccm destill. Wasser und 75 ccm Glycerin. Es setzt Alaun ab, soll sich aber sonst Jahre lang halten. Bei mir (Mayer) hat sich indessen schon nach 6 Monaten viel Farbstoff ausgeschieden. Rawitz empfiehlt es nur für Schnitte, entweder konzentrirt oder stark mit Wasser verdünnt. Ich sehe keinen besonderen Vortheil in seiner Anwendung.

Alle Gemische, die mit Alaun zubereitet werden, also auch die Alauncochenille, setzen bald rascher bald langsamer viel Farbstoff auf dem Grunde oder auch an den Wänden der Flaschen ab. Besonders gilt dies von der Alauncochenille. Nur das Karmalaun, das ich (Mayer) aus einer 1891 von E. Merck bezogenen Karminsäure bereitete, hat sich einige Jahre lang ganz unverändert erhalten. Leider ist mir dies seither nicht wieder geglückt, auch Zusatz von Säuren oder Salzen hilft nicht. Ebenso macht es trotz der Angabe von Rawitz (Anat. Anzeiger 15. Bd. 1899 p. 4.8 u. 442) keinen Unterschied, ob man Ammoniak- oder Kalialaun verwendet.

218. **Karminsäure und Aluminiumchlorid** nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1892 p. 490). In 200 g destill. Wasser löst man 1 g Karminsäure und 8 g Aluminiumchlorid und setzt wie beim Karmalaun ein Antiseptikum hinzu (§ 217). Verwendung wie Karmalaun; färbt blauviolett, sehr stark und elektiv, aber nicht so exklusiv die Kerne wie jenes. Zu empfehlen nur, falls aus irgend einem Grunde das Karmalaun des Alauns wegen nicht zu gebrauchen ist.

219. Alaunkarmin. GRENACHER (Arch. Mikr. Anat. 16. Bd. 1879 p. 465) kocht eine wässerige Lösung von 1—5 % (oder auch von beliebiger anderer Stärke) Kali- oder Ammoniakalaun 10–20 Minuten lang mit ½—1 % Karmin und filtrirt nach dem Erkalten.

Nach MAYER (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 29) färbt das Alaunkarmin stärker und mehr nach Roth hin, wenn man 2 g Karmin mit 5 g Alaun und 100 ccm Wasser 1 Stunde lang kocht; es ist dann ziemlich stark sauer geworden, indem der Alaun etwas Schwefelsäure abgegeben hat, die aus dem Karmin Karminsäure frei macht. Man erreicht also dasselbe, wenn man dem Alaunkarmin (oder dem Karmalaun) etwas Karminsäure zusetzt.

Unwesentliche und zum Theil auch irrationelle Abänderungen der Grenacherschen Formel s. bei TIZZONI (*Bull. Sc. Med. Bologna 1884 p. 259), PISENTI (*Gazz. Osped. Milano 1885 No. 24; Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 378) und GRIEB (*Mem. Soc. Ital. Sc. Tomo 6 1887 No. 9; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1880 p. 47).

Das Alaunkarmin ist neben den Theerfarbstoffen eins der besten Färbmittel. Es sei dem Anfänger besonders seiner bequemen Anwendung halber empfohlen: man kann kaum damit überfärben (ausgenommen Muskeln). Jedoch dringt es nicht leicht in die Tiefe und eignet sich daher gar nicht zum Durchfärben grosser Stücke. Man kann diesem Uebel allerdings einigermaassen durch Henneguys Mittel abhelfen (§ 220), falls man nicht zum Karmalaun greifen will.

220. Alaunkarmin und Essigsäure. HENNEGUY (Lee & Henneguy, Traité 1. Ed. 1887 p. 88) kocht Karmin in einer konzentrirten Lösung von Kalialaun in Wasser, fügt nach dem Erkalten 10 % Eisessig hinzu, lässt einige Tage absetzen und filtrirt. Zum Färben gibt er nur so viel von dem Gemisch zu destillirtem Wasser, dass dieses tief rosa wird, bringt der raschen Diffusion halber die Objekte direkt aus Alkohol hinein, lässt sie 1—2 Tage darin und wäscht sie 1—2 Stunden in destill. Wasser aus. In Glycerin halten sich die Präparate nicht so gut wie in Balsam.

Dieses Alaunkarmin dringt tiefer ein als das gewöhnliche und färbt in der Tiefe ebenso gut wie oberflächlich. Die Farbe ist ein etwas unschönes Violett, wird aber rother, wenn man die Objekte wie beim Boraxkarmin (§ 231) mit schwacher Salzsäure behandelt.

221. Alaunkarmin und Pikrinsäure. LEGAL (Morph. Jahrb. 8. Bd. 1883 p. 356) benutzt ein Gemisch von 10 Vol. Alaunkarmin und 1 Vol. gesättigter wässeriger Pikrinsäurelösung zum Färben, indessen ist, da sich die Pikrinsäure nachher leicht ganz auswäscht, dies Verfahren nicht so gut wie die Nachfärbung der nur roth gefärbten Schnitte mit Pikrinsäure.

222. Alauncochenille. PARTSCH (Arch. Mikr. Anat. 14. Bd. 1877 p. 180) kocht in einer 5 %igen Lösung von Alaun längere Zeit fein geriebene Cochenille, filtrirt und setzt als Antiseptikum etwas Salicylsäure hinzu.

Csokor (Arch. Mikr. Anat. 18. Bd. 1880 p. 413) gibt eine ähnliche Vorschrift: Cochenille und Alumen ustum je 7 g, Wasser 700 ccm, einzukochen auf 400 cm. — Nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1892 p. 496) enthält aber die Lösung nicht genug Alaun, während die von Partsch rationell ist; letztere hält sich auch besser. Mayer empfiehlt übrigens, um die Cochenille gründlicher auszuziehen, ausser den 5 % Alaun 1 % Kaliumnitrat zu nehmen. — Rabl (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 168) rühmt die Alauncochenille sehr, da sie kein spezifisches Kernfärbmittel sei; seine eigene Vorschrift ist: je 25 g Alaun und Cochenille, 800 ccm Wasser, einzukochen auf 600.

Alle diese Vorschriften liefern Gemische, die dem Alaunkarmin ganz nahe kommen, jedoch beim Färben vielleicht noch feinere Abstufungen in den Farbtönen ergeben; indessen hängt das ganz von der Qualität des Karmins und der Cochenille sowie der Gewebe selber ab. Jedenfalls ist die Alauncochenille genau so anzuwenden wie das Karmalaun; nur setzt sie in den Flaschen noch mehr und rascher ab als dieses.

223. Essigsäurekarmin. Schneider (Z. Anzeiger 3. Jahrg. 1880 p. 254) löst in kochender Essigsäure von 45 % Karmin bis zur Sättigung auf und filtrirt. (In dieser Stärke löst die Säure nach Schneider am meisten Karmin.) Die Lösung verdünnt man entweder auf 1 % und benutzt sie dann zum langsamen Färben, oder man gibt sie direkt zu dem lebenden Objekt unter dem Deckglase; alsdann fixirt sie und färbt zugleich. Sie dringt sehr leicht ein und gibt eine reine Kernfärbung, die aber nicht haltbar ist. Deshalb und auch aus anderen Gründen ist ihre Anwendung sehr beschränkt.

Pianese (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1894 p. 502) macht in ähnlicher Weise ein Ameisensäurekarmin. Wahrscheinlich gibt in allen Fällen, wo man Essigsäurekarmin braucht, Methylgrün bessere Resultate.

Die sogenannten Holzessigfarben von Burchardt (Arch. Mikr. Anat. 53. Bd. 1898 p. 232 ff.; s. auch Völtzkow in: Abh. Senckenb. Ges. Frankfurt 26. Bd. 1899 p. 108) sind, obwohl B. sie speziell für altes Material aus Chromgemischen sehr rühmt, nach Rawitz (Anat. Anzeiger 15. Bd. 1899 p. 443) und Mayer (Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd. 1899 p. 216) irrationell und unnöthig. Nachträglich hat denn auch Burchardt (Jena. Zeit. Naturw. 34. Bd. 1900 p. 720) selber die Formeln etwas verbessert.

224. Eisenkarminat. Zacharias (Z. Anzeiger 17. Jahrg. 1894 p. 62) färbt die Objekte ordentlich in einem Essigsäurekarmin (Karmalaun ist hierzu ebenso gut), spült sie mit schwacher Essigsäure ab und bringt sie in eine 1 %ige Lösung von citronensaurem Eisenoxyd-Ammonium (metallene Spatel etc. sind hierzu nicht zu brauchen, wenn man mit dem Essigsäurekarmin gefärbt hat). Darin bleiben sie, bis sie gut durchtränkt sind (etwa 2—3 Stunden, Schnitte nur wenige Minuten), aber nicht länger, da sie sonst zu schwarz werden. Man

wäscht sie dann tüchtig in destillirtem Wasser aus und bringt sie durch Alkohol etc. in Balsam. Gefärbt ist Alles, nach Zacharias graublau, in meinen (Lee) Präparaten das Chromatin blau, das Plasma braun. Mitunter mag die Methode nützlich sein.

Nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1892 p. 488) beruht obige Färbung darauf, dass das Aluminiumkarminat des Karmins nachträglich in Eisenkarminat umgewandelt wird.

Pfeiffer v. Wellheim (Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1898 p. 123) behandelt die Objekte (Süsswasseralgen) erst mit einer sehr schwachen Lösung von Eisenchlorid, dann nach gutem Auswaschen mit einer Lösung von Karminsäure und korrigirt mit schwacher Salzsäure ($^1/_{10}$—$^1/_2$ $^0/_0$ig) nach nochmaligem Auswaschen. Als Lösungsmittel und zum Waschen braucht er kein Wasser, sondern Alkohol von 5 $^0/_0$.

Bereits Weigert hat eine braunviolette Färbung der Präparate erhalten, die mit Karmin gefärbt und mit einem Gemisch von Alkohol und etwas Eisenchlorid ausgewaschen wurden (Arch. Path. Anat. 84. Bd. 1881 p. 278).

b) Basische und sogenannte neutrale.

225. Magnesiakarmin nach Mayer (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 23). Da die Lösungen des Karmins in wässerigem Ammoniak fortwährend Ammoniak verlieren, und die sonst gebräuchlichen (Natron- oder Lithionkarmin) meist zu stark alkalisch sind, so verwendet Mayer als Basis zum Lösen des Karmins die gebrannte Magnesia und gewinnt so Lösungen, die nicht nur konstant bleiben, sondern auch während der Zeit, die zum Färben erforderlich ist, die Gewebe nicht so stark schädigen (also z. B. die mit Eiweiss aufgeklebten Schnitte nicht loslösen), wie es sonst meist der Fall ist. Das starke Magnesiakarmin („Stammlösung") erhält man, indem man 1 g Karmin und 0,1 g Magnesia usta mit 50 ccm destillirtem Wasser 5 Minuten lang kocht, filtrirt und mit 3 Tropfen Formol versetzt. Beim Kochen löst sich nicht alles Karmin, aber ein Zusatz von Magnesia bessert das nicht, sondern schlägt nur schon gelöstes nieder; gelöst werden reichlich $1^1/_2$ $^0/_0$ Karmin. — Zur Bereitung des schwachen Magnesiakarmins löst man 0,1 g Karmin durch halbstündiges Kochen in 50 ccm Magnesiawasser, filtrirt und setzt ebenfalls Formol zu. (Das Magnesiawasser gewinnt man, indem man 0,1 g Magnesia usta mit 100 ccm Brunnenwasser eine Woche lang unter öfterem Umschütteln in Berührung lässt und beim Gebrauch klar abzieht; es bleibt nur dann alkalisch genug, wenn es auf der ungelösten Magnesia steht.)

Beide Magnesiakarmine halten sich sehr lange klar, das schwache sogar mehrere Jahre. Sie sind sowohl für Schnitte als auch für Objekte in toto zu gebrauchen; das starke färbt aber nicht erheblich stärker als das schwache. Nach dem Färben wäscht man mit Wasser gut aus. Am besten verwendet man übrigens das Magnesiakarmin mit einem Zusatz von Magnesiumpikrat (§ 229).

226. Ammoniakkarmin (s. auch § 230). Ist eigentlich heutzutage nicht mehr nöthig, will man es jedoch benutzen, was in der That noch manchmal beim Studium des Centralnervensystems geschieht, so sollte man wenigstens für die Entfernung des freien Ammoniaks so viel wie nur möglich sorgen, indem man die Lösung kocht. Am besten aber bereitet man es nach Ranvier (Arch. Phys. Paris (2) Tome 1 1874 p. 769; s. ferner Lee & Henneguy, Traité 1. Ed. p. 82), indem man einfach Karmin in Wasser mit nur geringem Ueberschuss an Ammoniak löst und es dann in einer tiefen Schale der Verdunstung überlässt; wenn es dabei faulen will, um so besser. Das trockene Pulver löst man in Wasser auf und filtrirt.

Das sogenannte karminsaure Ammoniak von Hoyer (Biol. Centralbl. 2. Bd. 1882 p. 17) ist nicht dieses, sondern ein trockenes Ammoniakkarmin, das sich in Wasser ohne Weiteres klar lösen muss. S. auch oben p. 151.

Aehnlich wie Hoyer stellt van Wijhe (Versl. Akad. Amsterdam (3) 8. Deel p. 507) ein trockenes A.-K. dar, indem er eine alte starke Lösung von Karmin in Ammoniak mit vielem Alkohol mischt und den dunkelrothen Niederschlag mit Alkohol wäscht und trocknet. Eine frische Lösung soll ein anderes Produkt ergeben, und das Reifen der Lösung auf Oxydation beruhen; koche man daher Karmin mit Wasser, Ammoniak und Wasserstoffhyperoxyd, so erhalte man bereits in wenigen Minuten eine Lösung mit den gewünschten Eigenschaften. (Beim Kochen mit Kaliumhypermanganat gehe die Oxydation leicht zu weit.)

Nach meiner (Mayer) Erfahrung mit einem Originalpräparate, das ich van Wijhe verdanke, reagirt das Pulver, wie es auch nicht anders sein kann, schwach alkalisch, löst sich trotzdem nicht klar in Wasser und setzt auch später fortwährend ab.

227. Lithionkarmin nach Orth (*Berlin. Klin. Wochenschr. 28. Jahrg. 1883 p. 421): in konzentrirter wässeriger Lösung von Lithiumkarbonat werden durch Kochen 2 ½—5 % Karmin aufgelöst. Ueberflüssig, macerirt stark (Mayer), wird aber merkwürdiger Weise sogar von Embryologen gebraucht. Behandlung der gefärbten Objekte wie beim Boraxkarmin (unten § 231).

228. Pikrokarmin. Unter Pikrokarmin versteht man gewöhnlich Gemische, worin Pikrinsäure, Ammoniak (oder Natron oder Lithion), Kohlensäure (auch wohl Essigsäure) und Karmin in willkürlichen Verhältnissen vorkommen. Ranvier, der Erfinder des Pikrokarmins, glaubt zwar, nach seiner Methode bereitet, sei es ein Doppelsalz von

Pikrinsäure und Karminsäure mit Ammoniak, also Ammoniumpikrokarminat. Davon kann aber schon deswegen keine Rede sein, weil Karmin keine Karminsäure ist, sondern auch Thonerde und Kalk enthält (s. oben p. 149). Vielmehr ist nach MAYER (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 18ff.) das gewöhnliche Pikrokarmin ein durchaus inkonstantes Gemisch von Ammoniumpikrat, Ammoniakkarmin und freiem Ammoniak und wirkt daher oft auf die Gewebe schädlich ein. Enthält es nur wenig freies Ammoniak und auch genug Ammoniakkarmin, so ergiebt es mitunter gute Doppelfärbungen (roth und gelb), indessen lassen sich diese ebenso gut oder wohl noch besser durch Vorfärben mit Boraxkarmin oder Parakarmin und Nachfärben mit Pikrinsäure (in Alkohol, Benzol, Terpentinöl etc. gelöst) erreichen.

Seine Verwendung ist nur dann anzurathen, wenn selbst so schwach saure Gemische wie Karmalaun etc. nicht gebraucht werden dürfen, z. B. falls Kalknadeln erhalten bleiben sollen; oder wenn macerirte Gewebe zu färben sind, die nicht schrumpfen dürfen. Da aber die gewöhnlichen Pikrokarmine meist entweder selber zu stark maceriren oder, wenn sie nur wenig freies Ammoniak enthalten, oft nicht distinkt genug färben, so ist das Feld ihrer Wirksamkeit noch enger. — In den Vorschriften wird häufig angegeben, man solle die gefärbten Objekte mit schwacher Säure behandeln, um distinktere Färbungen zu bekommen.

Von den **älteren Vorschriften** mögen hier folgende erwähnt werden. Die von RANVIER (Traité techn. 1. Ed. p. 100) ist ungenau; auch die aus seinem Laboratorium stammende, in Lee & Henneguy, Traité 2. Ed. 1896 p. 86 abgedruckte ergibt kein konstantes Präparat. Fernere Formeln publizirten GAGE (Amer. Month. Micr. Journ. Vol. 1 1880 p. 22; Journ. R. Micr. Soc. London Vol. 3 1880 p. 501); FOL (Lehrbuch p. 195); MAYER (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 20); BABER (*Month. Micr. Journ. Vol. 12 p. 48); PERGENS (Carnoy, Biol. cellulaire p. 92); HOYER (Biol. Centralbl. 2. Bd. 1882 p. 19); BIZZOZERO (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 539); KLEMENSIEWICZ (Sitzungsb. Akad. Wien 78. Bd. 1878 3. Abth. p. 35; Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 501); CUCCATI (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 42); POLJAKOFF (Arch. Mikr. Anat. 45. Bd. 1895 p. 574). Natronpikrokarmin bereitet LÖWENTHAL (Anat. Anzeiger 2. Jahrg. 1887 p. 22 und Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 313). WEIGERT (Arch. Path. Anat. 84. Bd. 1881 p. 283) stumpft das überschüssige Ammoniak nicht mit Pikrinsäure, sondern mit Essigsäure ab. ORTH (*Berlin. Klin. Wochenschr. 28. Jahrg. 1883 p. 421) bereitet mit seinem Lithionkarmin (§ 227) ein Lithionpikrokarmin, das aber natürlich ebenfalls stark macerirt.

Vor kurzem hat VAN WIJHE (Versl. Akad. Amsterdam (3) 8. Deel p. 506) für einen speziellen Fall (mit Osmiumsäure fixirte Embryonen, die sich nach der Bleichung mit den gebräuchlichen Kernfärbemitteln nicht mehr tingiren liessen) ein Ammoniakpikrokarmin hergestellt: er löst von seinem trockenen

Ammoniakkarmin (s. oben p. 157) $^1/_2$% in einer 1%igen Lösung von neutralem Ammoniumpikrat, kocht die nicht ganz neutrale Flüssigkeit in einem Kolben so lange, bis sich rothes Lakmuspapier in den Dämpfen nicht mehr bläut, und setzt als Antiseptikum 1% Chlorhydrat zu.

Ich (Mayer) habe sowohl das fertige Gemisch als auch die festen Substanzen dazu vom Autor erhalten und sehe meine theoretischen Einwände dagegen durch eigene Proben gerechtfertigt, denn z. B. das Originalgemisch ist sogar jetzt (11 Monate nach Empfang) noch nicht völlig klar geworden. Es färbt, da es nur Spuren von freiem Ammoniak enthält und sich in sogenannter Schwebefällung befindet, relativ stark, aber nicht distinkt genug. Dagegen macerirt es so gut wie gar nicht und gehört daher ohne Zweifel zu den besseren Pikrokarminen. Seine Bereitung ist übrigens durchaus nicht so einfach, wie van Wijhe meint.

229. Pikromagnesiakarmin nach Mayer (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 25). Zur Herstellung dient ausser dem Magnesiakarmin (§ 225) eine Lösung von Magnesiumpikrat, die man entweder durch Erhitzen von 200 ccm einer $^1/_2$%igen wässerigen Lösung von Pikrinsäure mit 0,25 g Magnesiumkarbonat bis zum Kochen, Absetzenlassen und Filtriren, oder durch Lösen von 0,6 g festem Salz (bei Grübler & Hollborn zu haben) in 100 ccm destill. Wasser erhält. Zu 10 Voll. dieser Lösung gebe man 1 Vol. des starken Magnesiakarmins, oder mische gleiche Theile der Lösung und des schwachen Magnesiakarmins mit einander. Gegen Schimmelpilze setze man etwas Formol zu.

Beide Arten Pikromagnesiakarmin enthalten höchstens $1^1/_2$ promille Karmin, färben aber nach Mayer Schnitte meist schon in einigen Minuten und eignen sich auch zum Durchfärben von Stücken, wirken überhaupt rascher und stärker als die gewöhnlichen Pikrokarmine, die meist viel mehr Karmin enthalten sollen.

Mayer räth selber vom Gebrauch jeglicher Art von Pikrokarmin, also auch dieses neuesten, durchaus ab und möchte es höchstens für ganz spezielle Zwecke reservirt wissen.

Das Magnesiumpikrat ist leichter ganz neutral zu erhalten, als das Ammoniumpikrat.

van Wijhe hat, wie er mir (Mayer) brieflich mittheilt, mit seinem Pikrokarmin (oben p. 158) bessere Färbungen erhalten als mit dem meinen, das ich ihm zu diesem Zweck übersandt hatte. Mir ist es umgekehrt ergangen; offenbar sind aber weder die Objekte noch auch unsere Ansprüche gleich gewesen.

230. Andere wässerige Gemische (meist veraltet). Saures Ammoniakkarmin nach Schweigger-Seidel (Ranvier, Traité, 1. Ed. p. 99; Frey, Mikroskop. 6. Aufl. 1877 p. 96). Ammoniakkarmin nach Beale (Frey, ibid. p. 95); nach Frey (ibid. p. 94: beide enthalten Glycerin und Alkohol); nach Hamann

(Internation. Monatschr. Anat. Hist. 1. Bd. 1884 p. 346; Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 87); nach PETRONE (Atti Accad. Gioenia Sc. N. Catania (4) Vol. 11 1898 p. 21). Neutrales Boraxkarmin nach NIKIFOROW (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 337); nach GRENACHER (Arch. Mikr. Anat. 16. Bd. 1879 p. 466); nach HAUG (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 151; 8. Bd. 1891 p. 52). Boraxkarmin nach WOODWARD (*Month. Micr. Journ. Vol. 7 1872 p. 38; Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 2 1879 p. 613); nach GIBBES (Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 3 1883 p. 390). Osmiumkarmin nach DELAGE (Arch. Z. Expér. (2) Tome 4 1886 p. 121; Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 240). Lösliches Karmin nach PERL (*Frey, Mikroskop 7. Aufl.; Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 91). Borsäurekarmin nach ARCANGELI (*Proc. Verb. Soc. Toscana Sc. N. 1885 p. 283; Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 377). Alaunkarmin mit Borsäure oder mit Salicylsäure nach ARCANGELI (ibid.). Salicylsäurekarmin nach ARCANGELI (ibid.). Pikrinsäurekarmin nach ARCANGELI (ibid.); nach MINOT (Whitman, Methods p. 42). Urankarmin nach GIERKE (Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 92); nach SCHMAUS (*Münchener Med. Wochenschr. 1891 p. 147; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 230). Sodakarmin nach CUCCATI (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 50).

B. Alkoholische Gemische.

231. Boraxkarmin. GRENACHER (Arch. Mikr. Anat. 16. Bd. 1879 p. 466) löst in einer 4 %igen wässerigen Lösung von Borax durch Kochen 2—3 % Karmin auf, setzt das gleiche Volumen Alkohol von 70 % hinzu und filtrirt nach längerem Stehen. Die Objekte lässt er in der Lösung, bis sie gut damit durchtränkt sind, eventuell Tage lang, und bringt sie dann, ohne sie auszuwaschen, in Alkohol von 70 %, der mit Salzsäure (4—6 Tropfen auf 100 ccm) angesäuert ist. Hierin bleiben sie, bis die Farbe sich aus dem Plasma auf die Kerne zurückgezogen hat, was ebenfalls Tage lang dauern kann; sie sehen dann hellroth, durchsichtig aus und kommen nun in neutralen Alkohol.

Das Boraxkarmin war eine Zeit lang von den Mitteln zum Durchfärben das gebräuchlichste. Es lässt sich leicht handhaben und gibt eine sehr schöne Färbung. Indessen dringt es nicht so gut durch, wie man gemeiniglich glaubt, und bildet zuweilen im Innern dicker Stücke Präzipitate, die sich auch im sauren Alkohol nicht wieder lösen. Ferner reagirt es alkalisch und eignet sich daher für Zellenstudien nicht. Man ist jetzt auch von seiner Anwendung etwas zurückgekommen.

Das Boraxkarmin ist schon 1865 von THIERSCH (Arch. Mikr. Anat. 1. Bd. 1865 p. 149) und ähnlich von WOODWARD (*Month. Micr. Journ. Vol. 7 1872 p. 38) benutzt worden, jedoch sind beide Vorschriften wenig rationell, scheinen

auch kaum richtig in Aufnahme gekommen zu sein, sodass erst Grenacher mit seiner Formel durchdrang.

Rein wässeriges Boraxkarmin macerirt gleich dem Lithionkarmin so stark, dass es für feinere Arbeiten unbrauchbar wird. Unter Umständen nimmt man daher statt des Gemisches von Grenacher besser das nach Mayer (§ 232).

Ueberträgt man die gefärbten Objekte aus dem Boraxkarmin in schwachen Alkohol oder Wasser, so wäscht sich darin fast der ganze Farbstoff wieder aus; man muss sie also direkt in 70%igen Alkohol bringen; in diesem schlägt sich aber das Karmin ganz diffus nieder und wird erst durch Säuren wieder gelöst, sodass es nun die Kerne tingirt; daher ist ganz richtig gleich saurer Alkohol vorgeschrieben.

232. Boraxkarmin. Mayer (Whitman, Methods p. 40) bereitet für zarte Objekte ein Boraxkarmin mit stärkerem Alkohol, etwa von 50—70%. Kochender Alkohol von 50—60% löst allerdings nur etwa 1% Borax und ebenso viel Karmin, der von 70% noch nicht 1/4% Borax, und das Boraxkarmin mit 70%igem Alkohol sieht ganz hell aus, aber das ist für kleine Objekte gerade vortheilhaft. Bereitung und Anwendung genau wie beim Boraxkarmin nach Grenacher (§ 231).

233. Parakarmin. Nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1892 p. 491) werden Karminsäure 1 g, Chloraluminium 1/2 g und Chlorcalcium 4 g in 100 ccm 70%igem Alkohol warm oder kalt gelöst; nach dem Absetzenlassen wird filtrirt. Hellroth, besonders gut zum Durchfärben, kommt einigermaassen dem Grenacherschen Boraxkarmin nahe.

Die Objekte dürfen nicht alkalisch reagiren oder viel Kalk (Spicula, Skelette) enthalten, der zu Niederschlägen Veranlassung geben würde. In der Regel färbt sich das Plasma etwas mit, aber das ist für Objekte, die geschnitten werden sollen, oder für Schnitte meist vortheilhaft, also wäscht man einfach mit Alkohol von 70% aus. Sollen aber die Objekte ungeschnitten in Balsam kommen, oder braucht man eine präzise Kernfärbung, so setzt man zum Waschalkohol ein wenig Chloraluminium oder etwa 5% Essigsäure von 50% (2 1/2% Eisessig). Färbt man grosse Thiere mit umfangreichen Höhlungen, z. B. Salpen, so verdünnt man am besten das Parakarmin stark mit 70%igem Alkohol, säuert es aber ein wenig an, da sonst leicht etwas Farbe ausfällt, besonders wenn die Objekte nicht ganz gut konservirt sind. Das Parakarmin gibt freilich keine so feurig rothen Tinktionen wie das Boraxkarmin, ist aber den Geweben weniger schädlich, dringt auch wegen seines stärkeren Alkohols besser durch, bildet in den Objekten nicht so leicht Niederschläge und hält sich, aus guter Karminsäure bereitet, Jahre lang völlig klar.

234. Salzsäurekarmin. Unter Umständen mag ein nicht alkalisches Karmingemisch mit noch stärkerem Alkohol, als das Parakarmin, von Vortheil sein, namentlich bei schwer durchdringlichen Objekten. Die älteste Vorschrift dazu, die von Grenacher (Arch. Mikr. Anat. 16. Bd. 1879 p. 468) ist nicht leicht zu befolgen und auch nicht präzis genug. Mayer hat sie etwas genauer formulirt und vereinfacht (Mitth. Z. Stat. Neapel 4. Bd. 1883 p. 521; Internation. Monatschr. Anat. Phys. 4. Bd. 1887 p. 43): 4 g Karmin werden in 15 ccm Wasser und 30 Tropfen Salzsäure durch Kochen gelöst; dann fügt man 95 ccm Alkohol von 85 % hinzu, filtrirt heiss, neutralisirt mit Ammoniak, bis ein bleibender Niederschlag gerade entstehen will, und filtrirt nach dem Erkalten eventuell nochmals. Zum Auswaschen der Objekte dient Alkohol von 80—90 %, und wenn man reine Kernfärbung haben will, so muss er mit Salzsäure versetzt sein; auch die Lösung darf man nur mit starkem Alkohol verdünnen.

235. Cochenilletinktur. Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 14) lässt pulverisirte Cochenille mehrere Tage lang mit dem 8—10 fachen an Alkohol von 70 % in der Kälte in Berührung, schüttelt sie öfter um und filtrirt die klare Tinktur ab. (Enthält das Filtrirpapier viel Kalk, so fallen schon bald nachher Flocken von Calciumkarminat aus.)

Die Objekte bringt man vorher in Alkohol von 70 % und wäscht nachher die überflüssige Farbe mit ebenso starkem Alkohol wieder ganz sorgfältig aus (zum Verdünnen der Tinktur muss gleichfalls Alkohol von 70 % genommen werden). Warmer Alkohol wäscht rascher aus als kalter. Ueberfärbung kommt selten vor und lässt sich leicht durch etwas sauren Alkohol (mit $^1/_{10}$ % Salzsäure oder 1 % Essigsäure) korrigiren. Kleine Objekte sowie Schnitte färben sich in einigen Minuten durch, grosse brauchen Stunden oder gar Tage. Die Farbe geht fast ausschliesslich an die Kerne; sie wechselt je nach der Reaktion der Gewebe und der An- oder Abwesenheit gewisser Salze darin (s. hierüber oben § 215). Crustaceen mit dickem Chitin werden in der Regel roth, die meisten anderen Thiere blau. Oft zeigen sich auch in demselben Objekte die Gewebe verschieden gefärbt: so werden Drüsen oder ihr Sekret oft graugrün; in Embryonen von *Lumbricus* fand Kleinenberg die Blutgefässe roth, ihren Inhalt aber intensiv blau gefärbt. Säuren ändern die Farbe nach gelblich roth hin, kaustische Alkalien in ein tiefes Purpurn.

Die besten Färbungen liefern Objekte, die mit Chrom- oder Pikringemischen oder mit Alkohol konservirt sind; aus denen mit Osmium hat man letzteres vorher durch Bleichen (§ 568) wegzuschaffen. Auch die Säuren müssen gut ausgewaschen worden sein, sonst wird die Färbung diffus. In Nelkenöl oder Balsam ist sie haltbar.

In Folge ihres leichten Eindringens in die Tiefe ist die Cochenilletinktur besonders da werthvoll, wo chitinige Membranen den wässerigen Karmingemischen grosse Hindernisse in den Weg legen würden. Ferner enthält sie keine freie Säure, kann also auch für Objekte mit Kalk-

einlagerungen (Nadeln etc.), die nicht zerstört werden dürfen, z. B. für die Pluteuslarven, angewandt werden. Immerhin ist ihre Anwendung sehr beschränkt, da sie, um wirklich gute Färbungen zu liefern, ja die Gegenwart geeigneter Salze in den Geweben voraussetzt. (Dies gilt nicht von der neuen Cochenilletinktur, die bereits in sich die nöthigen Salze zur Hervorbringung einer sehr elektiven Färbung enthält, mithin auf alle Objekte passt; s. § 236.)

Wie bei der Alauncochenille, so hängt auch bei dieser Tinktur sehr viel von der Güte der Cochenille selber ab.

236. Neue Cochenilletinktur nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1892 p. 498): Cochenille 5 g, Chlorcalcium 5 g, Chloraluminium $^1/_2$ g, Salpetersäure (von 1,20 spez. Gew.) 8 Tropfen, Alkohol (von 50°/₀) 100 ccm. Die fein pulverisirte Cochenille wird in einem Mörser mit den Salzen gut gemischt, mit dem Alkohol und der Säure versetzt, das Ganze bis zum Kochen erhitzt, einige Tage unter häufigem Umschütteln kalt stehen gelassen und filtrirt.

Anwendung wie bei der alten Tinktur, nur wird stets Alkohol von 50°/₀ statt des 70°/₀igen genommen. Die Färbung ist ähnlich der mit Parakarmin, nur nicht ganz so stark und präzis. Mayer empfiehlt sie daher auch nur als einen Ersatz für dieses. Im Uebrigen s. die Bemerkungen am Schluss des vorigen § und wegen der Theorie der Färbung § 215.

12. Kapitel.

Färben mit Hämatoxylin- oder Hämateïngemischen.

237. Theorie des Färbens mit Hämatoxylingemischen. Wie MAYER (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1891 p. 170) gezeigt hat, ist das wirksame Prinzip in den sogenannten Hämatoxylinen der Histologen nicht Hämatoxylin, sondern Hämateïn, und dieses entsteht aus jenem durch die „Reifung“, d. h. durch Oxydation. Bevor also derartige Gemische reif sind, taugen sie nicht zum Färben. Früher hat man sie einfach durch Stehen an der Luft reifen, d. h. sich oxydiren lassen; kräftige Oxydationsmittel hingegen, z. B. Kaliumhypermanganat oder Wasserstoffhyperoxyd (s. auch UNNA in: Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1892 p. 483) oder Quecksilberoxyd verwandeln die farblose Lösung des Hämatoxylins augenblicklich in die braune des Hämateïns. (S. hierüber auch § 248.)

Aber auch das Hämateïn färbt allein nicht in befriedigender Weise, sondern verleiht im Allgemeinen den Objekten nur einen hellbraunen Ton, und es verhält sich damit ähnlich wie mit der Karminsäure (s. § 214), die auch allein nur diffus und ganz schwach tingirt. Es muss eben noch eine Basis dazu kommen, und diese ist entweder Eisen, Chrom, Kupfer etc. (Genaueres in § 256) oder Aluminium. In der That enthalten alle sogenannten Hämatoxyline Alaun oder ein anderes Thonerdesalz, und nach Mayer kommt die Färbung dadurch zu Stande, dass sich in den Geweben (besonders in den Kernen) die in Wasser, Alkohol etc. unlösliche Verbindung Hämateïn-Thonerde niederschlägt.

Die gewöhnliche Redeweise, man färbe mit Hämatoxylin, ist, wie aus dem Gesagten hervorgeht, ungenau; es muss heissen, man färbe mit Hämateïnthonerde, oder man sollte wenigstens angeben, welches Gemisch man benutzt, also z. B.: gefärbt mit Hämatoxylin nach Böhmer, mit Hämateïn IA von Apáthy, mit Hämatoxylin nach Ehrlich u. s. w. Mayer hat deswegen für sein Gemisch von Hämateïn, Alaun und Wasser den kurzen Ausdruck Hämalaun eingeführt. Neuerdings (Anat. Anzeiger 13. Bd. 1897 p. 313) zeigt MAYER auch, dass der

Hauptbestandtheil des Chromatins der Kerne, die Nucleïnsäure, sich mit Hämateïn allein nicht färbt, dagegen aus Alaun Thonerde und aus Hämalaun Hämateïnthonerde an sich bindet.

Die Reifung der gewöhnlichen Hämatoxylingemische, die also neben dem Hämatoxylin hauptsächlich ein Thonerdesalz enthalten und frisch bereitet in der Regel selber farblos sind, dauert an der Luft meist Monate, wenigstens aber, wenn man die Flaschen absichtlich nicht gut verschliesst, Wochen lang. (Nimmt man statt des Hämatoxylins das Hämateïn, so sind sie sofort zum Gebrauche fertig.) Auch oxydirt sich nicht sogleich alles Hämatoxylin; man kennt demnach den Gehalt an wirksamem Farbstoffe nie auch nur einigermaassen genau. Andererseits schreitet die Oxydation auch langsam, aber unaufhörlich fort und verwandelt das Hämateïn in Körper, die nicht mehr färben; so sind denn die gewöhnlichen Hämatoxylingemische ganz inkonstante Gemenge von unreifen, reifen und überreifen Bestandtheilen, daher auch in ihrer Wirkung häufig unberechenbar. Endlich aber ändert sich im Laufe der Zeit in den Gemischen, die Alaun enthalten, die Reaktion gegen Lackmuspapier: sie werden weniger sauer und färben dann auch manchmal anders als zu Beginn (s. unten § 800).

Wenn sich also auch die sogenannten Hämatoxyline nach Mayers Vorgange viel rascher und sicherer mit Hämateïn bereiten lassen, so kann man doch immer noch in einer für die Bedürfnisse der Praxis ziemlich ausreichenden Weise vom Hämatoxylin ausgehen, indem man dieses in alkoholischer Lösung vorräthig hält: entweder, wie schon Böhmer angegeben hat, etwa 1 : 10 in absol. Alkohol, oder nach Apáthy 1 : 100 in 70%igem Alkohol (s. § 249 und 252). Solche Lösungen enthalten bereits nach einigen Wochen ziemlich viel Hämateïn und können dann in entsprechender Proportion statt des festen Hämatoxylins oder Hämateïns verwandt werden.

Bisher ist nur von den Gemischen die Rede gewesen, die schlechthin Hämatoxyline genannt werden, in Wirklichkeit aber auch Aluminium als Basis enthalten und beide Stoffe gleichzeitig auf die Objekte einwirken lassen. Etwas anders steht es in den Fällen, wo als Basis Eisen, Kupfer, Chrom etc. benutzt wird: hier bringt man in der Regel zuerst die Basis mit dem Objekt in Berührung, später erst die Lösung von Hämatoxylin (seltener Hämateïn), und hierbei entsteht dann aus der Verbindung der beiden Körper im Objekte ein Farbsalz (Lack), worin das Hämatoxylin wohl immer noch höher oxydirt ist als nur zu Hämateïn.

Bei dieser Art von Färbung, die meist zu speciellen Zwecken dient, ist im Namen meist auch die Basis angegeben, z. B. Färbung mit Eisenhämatoxylin.

238. Blauholz (Blut- oder Campecheholz). Es ist das Kernholz der in Mittelamerika heimischen Leguminose *Haematoxylon campechianum*. Frisch ist es farblos, „fermentirt“ oder „gereift“ dunkel, da in ihm das Hämatoxylin bereits zum Theil in Hämateïn umgewandelt ist. Die Abkochung des gereiften Holzes enthält beide Stoffe, das Blauholzextrakt im Wesentlichen Hämateïn.

Bevor man das Hämatoxylin kannte, hat man namentlich in England zum Färben das Holz (Logwood) oder das käufliche Extrakt unter Zugabe von Alaun verwandt, ist aber mit Recht davon abgekommen. Neuerdings werden beide zwar noch hie und da (Breglia, Dippel, Paneth, Petrone, Spuler) empfohlen, zum Theil wegen der Billigkeit, aber auch weil man zu glauben scheint, das Tannin des Holzes wirke beim Färben irgendwie mit. Aber ihre Verwendung ist kaum noch rathsam, besonders da das Extrakt sehr häufig stark verfälscht wird.

239. Hämatoxylin. Das Hämatoxylin ($C_{16}H_{14}O_6$) wird aus dem Blauholz durch Ausziehen mit wasserhaltigem Aether gewonnen und bildet farblose, meist aber durch Oxydation aussen etwas braune Kristalle mit 1 oder 3 Molekülen Kristallwasser, die süss schmecken und sich in Wasser, Glycerin und Alkohol ziemlich leicht lösen. (Die Lösungen oxydiren sich, besonders bei Gegenwart eines Alkalis, schon an der Luft und gehen dabei in das Hämateïn oder noch höhere Oxydationstufen über.) Es ist nicht flüchtig, verhält sich wie eine schwache Säure und bildet Salze, die begierig Sauerstoff aufnehmen und zu Hämateaten werden. Zum Färben taugt es allein nur ganz selten (es wird von den Botanikern benutzt, s. hierüber Mayer in: Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd. 1899 p. 198), vielmehr muss stets eine Basis entweder 1) im Objekt bereits vorhanden sein oder 2) eigens (durch eine Beize) vorher oder auch nachher hineingebracht oder 3) dem Gewebe zugleich mit dem Hämatoxylin dargeboten werden. Die Salze aber, die hierbei entstehen, die sogenannten Farblacke, enthalten nie das Hämatoxylin selber, sondern wenigstens das Hämateïn oder noch höhere, nicht genau bekannte Oxydationstufen.

240. Hämateïn. Das Hämateïn ($C_{16}H_{12}O_6$) soll braunrothe Kristalle mit gelbgrünem Metallglanze bilden, ist aber im Handel nur als braunes Pulver zu haben. Aus dem Hämatoxylin (§ 239) entsteht es durch vorsichtige Oxydation mit Salpetersäure, Kaliumhypermanganat etc. (s. auch unten § 248) oder durch Stehenlassen einer Lösung an der Luft. Es ist löslich in Wasser, Alkohol, Essigsäure, Aether, besonders leicht und mit violetter Farbe in Alkalien, unlöslich in Chloroform und Benzol. Alte Lösungen verderben durch Oxydation.

Für die Bedürfnisse des Mikrotechnikers genügt an Stelle des reinen Hämateïns meist eine alte Lösung von Hämatoxylin in Alkohol

(s. oben p. 165), besser aber noch das Hämateïn-Ammoniak, das man sich leicht selbst bereiten (§ 241), indessen auch z. B. bei Grübler & Hollborn haben kann.

Bethe (Arch. Mikr. Anat. 55. Bd. 1900 p. 525) empfiehlt zur raschen Oxydation von Hämatoxylinlösungen die Durchleitung von Luft. Wenn die Vorrichtungen dazu bequemer wären, so könnte diese Methode ganz praktisch sein.

241. Hämateïn-Ammoniak. Nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1891 p. 172) löst man 1 g Hämatoxylin durch Erwärmen in 20 ccm destillirtem Wasser, filtrirt, wenn nöthig, gibt 1 ccm Ammoniak (von 0.875 spez. Gew.) hinzu und giesst die Flüssigkeit in eine Schale, die so geräumig ist, dass jene darin nicht höher als $^1/_2$ cm steht. Man lässt nun bei gewöhnlicher Temperatur an einem staubfreien Orte das Wasser und Ammoniak verdunsten und kratzt den Rückstand, der etwa 1 g betragen muss, von der Schale los. Beschleunigung der Operation durch Abdampfen in der Wärme liefert Nebenprodukte, die in Alkohol unlöslich sind; auch darf man die Flüssigkeit nur mit Stäben (oder Spateln etc.) aus Glas, Porzellan oder Platin umrühren.

Das Produkt fällt aus nicht näher bekannten Gründen nicht ganz constant aus; vielleicht enthält es noch Stufen zwischen dem Hämateïn und Hämatoxylin. Jedenfalls muss es sich leicht in Wasser oder Alkohol lösen, und die Lösung darf bei Zusatz von Essigsäure nicht merklich trübe werden, sonst ist die Oxydation zu weit gegangen.

242. Allgemeine Bemerkungen. Die Hämatoxylin- und Hämateïngemische gewähren vor den Theerfarben und den Karmingemischen den Vortheil, dass sie auch Objekte, die mit Osmium- oder Chromgemischen konservirt sind, relativ gut färben und dass sie überhaupt stärker tingiren als die Karmingemische. Je nach der Art ihrer Anwendung liefern sie reine Kernfärbungen oder auch Plasmafärbungen, indessen kommen die meisten unter den letzteren nicht durch die Verbindung mit Thonerde, sondern mit Eisen, Chrom etc. zu Stande. Genaueres in § 257 ff. und in 700 ff.

A. Verbindungen des Hämateïns mit Thonerde.

243. Charakter der Färbungen mit Hämateïn-Thonerde (fälschlich: mit Hämatoxylin). Obwohl man das Hämateïn und die Thonerde den Geweben nacheinander zuführen kann und dann auch Färbungen erzielt, so geschieht dies doch nur selten (§ 245). Allermeist werden beide Komponenten in einer und derselben Lösung dem Objekte dargeboten.

Je nach der Zusammensetzung des Färbgemisches nun fallen die Färbungen in verschiedenen Tönen von Blau bis Roth aus: neutrale Gemische tingiren mehr blau, saure mehr roth. Gewöhnlich verleiht man den Geweben, die aus einem sauren Gemische kommen, einen blauen Ton, indem man sie in ganz schwaches Ammoniak bringt, aber man erhält dasselbe Resultat auch durch Auswaschen mit Brunnen- oder Leitungswasser, das in der Regel etwas alkalisch reagirt, oder durch einen Zusatz von Natriumbikarbonat oder von Kalium- oder Natriumacetat (1:200 bis 1:100) zum Waschwasser (oder später zum Alkohol). Das ist auch vorzuziehen, da Ammoniak zarten Objekten leicht schadet.

Nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1891 p. 179) handelt es sich hierbei nicht um ein einfaches Neutralisiren der Gewebe, denn die genannten Acetate schlagen selbst bei Gegenwart von freier Essigsäure den Farbstoff blau nieder; vielmehr fällt das Ammoniak etc. die Thonerde aus, und diese reisst das Hämateïn mit nieder (ohne Thonerde würde das Hämateïn durch das Ammoniak ja violett werden). — Fischer (Fixirung p. 156) versucht für diese Vorgänge eine andere, komplizirtere Erklärung.

Einige Hämateïngemische, die relativ zu viel Hämateïn enthalten, haben eine grosse Neigung zum Ueberfärben. Man zieht das Zuviel hinterher leicht durch Auswaschen mit Alaunlösung, noch leichter mit ganz schwachen Säuren (z. B. mit Salzsäure von $^1/_{10}$, $^1/_5$ oder $^1/_2$ %, oder Oxalsäure oder Weinsteinsäure) aus, muss dann aber die Säure gründlich wieder entfernen, entweder durch viel reines Wasser (oder Alkohol), oder noch besser durch Ammoniak oder Natriumbikarbonat ($^1/_{10}$ %; nach Wistinghausen setzt man dies zum 70 %igen Alkohol). Am besten vermeidet man natürlich von vornherein die Ueberfärbung, indem man die Objekte nicht zu lange in den Färbgemischen lässt. — Auch sehr schwache Gemische überfärben nicht leicht, selbst nicht, wenn man die Objekte Tage lang darin lässt, aber dann resultirt keine reine Kernfärbung, wenigstens nicht, wenn man das starke Färbgemisch nur mit Wasser verdünnt. Will man also reine Kernfärbung haben, so muss man entweder ein starkes Gemisch nehmen oder es mit einer Alaunlösung verdünnen oder es bei der Verdünnung mit Wasser zugleich etwas ansäuern. Enthält aber ein Gemisch viel Glycerin und nicht zugleich Säure, so liefert es nie eine reine Kernfärbung. Manche Forscher ziehen übrigens der letzteren eine Färbung sämmtlicher Theile der Zelle, natürlich in verschiedenen Tönen von Violett und Blau, vor, während andere das Plasma lieber mit besonderen Färbmitteln (Eosin etc.) tingiren.

Die Farbe hält sich in Balsam, bleicht aber gern etwas und unter Umständen sogar stark aus. Hat man beim Färben irgendwie Säuren angewandt, so muss man sie vor dem Einschliessen in Balsam sorgfältig auswaschen (s. oben). Auch darf man nie Balsam nehmen, der mit Terpentinöl verdünnt ist (s. auch § 245). In Glycerin hält sich die Farbe nach älteren Angaben nicht zuverlässig, während Mayer wenigstens für einige Monate das Gegentheil garantirt.

244. Konstante Gemische. Unna (Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1892 p. 483) will durch Zusatz eines reduzirenden Mittels zu einem bereits reifen Gemische dieses konstant machen: er löst 1 g Hämatoxylin und 10 g Alaun in 100 ccm Alkohol und 200 ccm Wasser, lässt das Gemisch 2—3 Tage lang stehen, sodass es bereits einigermassen färbt, und fügt nun 2 g sublimirten Schwefel hinzu. Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 309) findet aber, dass der Schwefel das Gemisch doch nicht lange konstant erhält, und empfiehlt seinerseits das Glychämalaun (§ 247). Ziemlich unveränderliche Gemische sind übrigens das von Ehrlich (§ 251) und das von Apáthy (§ 252).

245. Hämalaun. Nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1891 p. 172) wird 1 g Hämateïn (oder Hämateïn-Ammoniak) durch Erwärmen in 50 ccm Alkohol von 90 % gelöst und zu einer Lösung von 50 g Alaun in 1000 ccm destillirtem Wasser gegossen. Nach dem Erkalten wird eventuell filtrirt. (Man kann auch das Häm. statt in Alkohol durch Zerreiben im Mörser mit etwas Glycerin lösen.)

Das Hämalaun ist sofort zum Gebrauch bereit; es ist etwa von der Farbe des Boraxkarmins, wird aber allmählich mehr blauviolett, besonders in Flaschen von leicht zersetzbarem Glase, und bildet auch mit der Zeit an den Wänden der Flasche, auf dem Boden und an der Oberfläche Niederschläge; man schöpft daher am besten mit einer Pipette mitten aus der Flasche und wischt die Pipette, bevor man das Hämalaun aus ihr herausfliessen lässt, aussen gut ab. Es färbt Schnitte manchmal fast augenblicklich, jedenfalls aber in sehr kurzer Zeit, und eignet sich auch vorzüglich zum Durchfärben; dies kann allerdings 24—48 Stunden dauern, und das Auswaschen mitunter ebenso lange. In der Regel resultirt in den Schnitten eine reine Kernfärbung, und jedenfalls lässt sie sich durch Auswaschen mit Alaunwasser (1—2 %iger Lösung von Alaun) erzielen; dies gilt auch vom Durchfärben. Man muss aber unter allen Umständen den Alaun (des Hämalauns oder des Alaunwassers) gut wieder auswaschen, da er sich sonst im Balsam als Kristalle bemerkbar macht, und thut auch gut daran, nach dem destillirten Wasser

noch Leitungswasser oder ein anderes Mittel zum Bläuen der Farbe (s. oben p. 168) anzuwenden. Auch zum Verdünnen des Hämalauns (bis auf $^1/_{20}$) nimmt man am besten Alaunwasser, nie aber Leitungswasser. — Beim Ueberführen der gefärbten Objekte in Balsam (oder Paraffin etc.) vermeide man Bergamott- und Nelkenöl und verwende Chloroform, Xylol oder Benzol; auch der Balsam sei nur in einem dieser 3 Stoffe gelöst (s. § 430 u. 431.)

Hämalaun lässt sich zu Doppelfärbungen mit Karmalaun, Säurefuchsin, Indigkarmin etc. (§ 314, 324, 345) mischen; besser noch färbt man aber mit diesen Stoffen nachher besonders.

Gerade wie bei dem sogenannten Böhmerschen Hämatoxylin (§ 249) braucht man sich bei dem Hämalaun nicht genau an die obigen Proportionen zu halten, sondern kann ein Hämalaun extemporiren, indem man zu einer Alaunlösung von gewünschter Stärke einige Tropfen einer Lösung von Hämateïn in Alkohol oder Glycerin hinzufügt. Oder man behandelt die Objekte nacheinander mit einer wässerigen Lösung von Hämatoxylin und von Alaun (NISSEN in: Arch. Mikr. Anat. 26. Bd. 1886 p. 338; KOSTANECKI & WIERZEJSKI, ibid. 47. Bd. 1896 p. 314, und manche Andere), oder auch umgekehrt, und erhält dann je nach den Umständen nur die Kerne oder auch das Plasma gefärbt. — S. auch unten § 832 (DUBOSCQ).

Leider ist wie das Karmalaun auch das Hämalaun nicht gar lange haltbar. Ich (MAYER) habe schon seit Jahren allerlei Zusätze (Chlorammonium, Ammoniumoxalat etc.) probirt, allein vergebens. Nur Glycerin — und noch besser dieses mit Säure, wie es Ehrlich angegeben hat (§ 251) — hilft, aber dann muss man auf ganz reine Kernfärbung verzichten.

246. Saures Hämalaun (nach MAYER ibid. p. 174 Anm.): Hämalaun mit 2% Eisessig (oder 4% Essigsäure von 50%). Anwendung wie oben, Auswaschen mit Leitungswasser zur Bläuung der Farbe erforderlich. Färbt noch präziser als das Hämalaun und hält sich auch länger unzersetzt.

247. Glychämalaun nach MAYER (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 310). Man zerreibt 0,4 g Hämateïn (oder Hämateïn-Ammoniak) in einem Mörser mit einigen Tropfen Glycerin und setzt dazu eine Lösung von 5 g Alaun in 30 ccm Glycerin und 70 ccm destill. Wasser. Eventuell zu filtriren. Hält sich einige Jahre lang (etwas Alaun kann auskristallisiren), wirkt ziemlich rasch und sehr stark, gibt aber durchaus keine scharfe Kernfärbung; will man diese, so muss man wenigstens mit Alaunwasser, mitunter sogar mit schwacher Säure auswaschen.

Aehnlich in Zusammensetzung, Haltbarkeit und Wirkung ist das Gemisch von RAWITZ (Leitfaden 2. Aufl. p. 63): 1 g Hämateïn, 6 g Ammoniakalaun, je 200 ccm Wasser und Glycerin. Es ist zwar relativ sehr arm an Alaun, aber die Hämateïn-Thonerde wird hier durch das Glycerin in Lösung gehalten, statt wie sonst durch den Alaun.

248. Gemische ähnlich dem Hämalaun. HANSEN (Z. Anzeiger 18. Jahrg. 1895 p. 158) oxydirt ein Gemisch von Hämatoxylin, Alaun und Wasser durch Kochen mit Kaliumhypermanganat und ist der Ansicht, dieses Hämalaun halte sich, da die Bakterien durch das Kochen vernichtet seien, länger als das gewöhnliche. Bei mir (LEE) hat es aber schon nach einigen Tagen eine Haut und einen starken Niederschlag gebildet, und Mayer schreibt mir dasselbe. — MAYER (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 309) hält die Gegenwart des Mangans in der Lösung für unvortheilhaft und räth statt dessen an, das Hämatoxylin in starkem Alkohol zu lösen, nur kurze Zeit mit dem Hypermanganat in Berührung zu lassen und dann gleich in der richtigen Menge zur Alaunlösung (von 5%) zu geben.

HARRIS (Micr. Bull. Philadelphia Vol. 15 1898 p. 47; Journ. Appl. Micr. Vol. 3 1900 p. 777) geht theoretisch richtiger zu Werke als Hansen, indem er dem Hämatoxylin seinen Sauerstoff durch Quecksilberoxyd zuführt, da sowohl dieses als auch das aus ihm entstehende Oxydul sich mit dem Hämateïn nicht verbinden. Er erhitzt die fertige Lösung von 1 g Hämatoxylin und 20 g Alaun in 200 ccm Wasser mit 1/2 g Quecksilberoxyd zum Kochen. Indessen enthält dieses Gemisch nach MAYER (Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd. 1899 p. 209) ebenfalls zu viel Hämateïn, und nimmt man dieselben Proportionen wie beim Hämalaun (also 1:1000), so ist es auch nicht besser als dieses.

Ueber die Gemische von Burchardt (sogenannte Holzessigfarben) s. oben § 223.

Neuerdings habe ich (MAYER) mehrere Versuche mit anderen Oxydationsmitteln angestellt. Als unbrauchbar hat sich erwiesen das Magnesiumhyperoxyd. Dagegen sind nicht übel Kalium- oder Ammoniumhypersulfat; die dabei frei werdende geringe Menge Schwefelsäure schadet ja nicht. Für 1 g Hämatoxylin genügen 0,4 g Kaliumhypersulfat. (Auch in 90%igem Alkohol lässt sich das Hämatoxylin damit leicht oxydiren, und so hätte man eine bequeme Methode zur Gewinnung des trockenen Hämateïns, wenn man nur die Schwefelsäure auf gute Manier loswerden könnte.)

249. Böhmers Alaunhämatoxylin. BÖHMER (Arch. Mikr. Anat. 4. Bd. 1868 p. 345; *Aerztl. Intelligenzbl. Baiern 1865 p. 549) setzt zu einem Uhrglase voll einer Alaunlösung (1:240 Wasser) einige Tropfen einer braun gewordenen Hämatoxylinlösung (1 : 12 absol. Alkohol). Nur noch von historischem Interesse als das älteste Gemisch dieser Art.

Böhmer wäscht die Schnitte mit einer Lösung von Weinsteinsäure in Alkohol aus und schliesst sie in Rizinusöl oder Glycerin ein. Er hat auch schon beobachtet, dass die mit Chromgemischen oder Kupfervitriol behandelten Objekte sich mit Hämatoxylin allein (in Wasser gelöst) färben, allerdings weniger distinkt als bei Gegenwart von Alaun.

250. Delafields Alaunhämatoxylin (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 288), fälschlich nach Grenacher oder Prudden benannt. Zu 400 ccm einer gesättigten Lösung von Ammoniakalaun (1 Theil löst sich in etwa 11 Theilen Wasser) setzt man eine Lösung von 4 g Hämatoxylin in 25 ccm starkem Alkohol und lässt das Gemisch in einer offenen Flasche 3—4 Tage stehen. Dann filtrirt man, gibt 100 ccm Glycerin und ebenso viel Methylalkohol hinzu, filtrirt wieder, lässt das Gemisch so lange (wenigstens 2 Monate) offen stehen, bis es dunkel genug geworden ist, und schliesst erst dann die Flasche. Es hält sich nicht lange unzersetzt. Zum Färben verdünnt man es mit viel Wasser, lässt aber die Objekte, da es sehr stark färbt, nicht zu lange darin. — Bütschli (Untersuch. Mikr. Schäume Leipzig 1892 p. 80; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 197) empfiehlt als saures Hämatoxylin eine sehr starke Verdünnung des Delafieldschen Gemisches mit so viel Essigsäure, dass sie entschieden roth ist: sie färbt dann die Kerne schärfer. — S. auch unten § 671 die Angaben von Stilling & Pfitzner. — Harris (Journ. Appl. Micr. Vol. 3 1900 p. 779) macht die lange Reifung des Hämatoxylins dadurch überflüssig, dass er es mit Quecksilberoxyd direkt in Hämateïn überführt (s. oben § 248).

Doppelfärbungen. Kathariner (Z. Jahrb. Abth. Morph. 10. Bd. 1897 p. 58) färbt die Schnitte durch den entkalkten Oberkiefer von Giftschlangen erst gut mit Pikrokarmin, wäscht sie aus und färbt sie dann einige Minuten lang mit verdünntem Gemisch von Delafield: an den Zähnen das unverkalkte Dentin roth, das verkalkte blau, etc. — S. auch Rabls Doppelfärbung mit Safranin (unten § 285).

251. Ehrlichs Alaunhämatoxylin. Ehrlich (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 150) nimmt 2 g Hämatoxylin, 100 ccm absoluten Alkohol, 10 ccm Eisessig, je 100 ccm Glycerin und Wasser, endlich Alaun im Ueberschuss und lässt dies Gemisch in einer offenen Flasche dunkelroth werden. Es hält sich dann, gut verschlossen, Jahre lang unverändert. Schnitte färbt es sehr rasch, soll auch Stücke gut durchfärben und nicht überfärben. Von allen älteren Gemischen gibt dieses die schärfste Kernfärbung. — Mann (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1895 p. 487) nimmt statt des Hämatoxylins Hämateïn, aber nach mündlicher Mittheilung an Mayer nur den 4. Theil davon.

Aehnlich dem Gemisch von Ehrlich ist das von Friedländer, enthält aber keine Säure.

Ehrlich & Lazarus (Anämie 1. Abth. Wien 1898 p. 28) lösen zu Doppelfärbungen von vorne herein ½ g Eosin darin auf. Aehnlich ist das Gemisch von Everard, Demoor & Massart (Ann. Inst. Pasteur Tome 7 1893 p. 166), enthält aber keine Essigsäure. — S. auch unten § 324 das Gemisch von Renaut.

252. Hämateïnlösung I A. Apáthy (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1897 p. 712) mischt gleiche Theile Glycerin, einer 9 %igen Alaunlösung (9 % Alaun, 3 % Eisessig und $^1/_{10}$ % Salicylsäure in destill. Wasser gelöst) und einer 1 %igen Hämateïntinktur. Diese wiederum ist lediglich eine 1 %ige Lösung von Hämatoxylin in 70 %igem Alkohol, die in nicht ganz voller Flasche bei gewöhnlicher Temperatur etwa

6—8 Wochen lang gestanden hat und daher bereits eine ziemliche Menge Hämateïn enthält. Die Tinktur sowohl als die Hämateïnlösung I A. sollen sich Jahre lang halten. (In Neapel thut jene es nicht, sondern ist schon nach Jahresfrist zum Theil überoxydirt.) Apáthy benutzt die Hämateïnlösung besonders zur Färbung der nervösen Primitivfibrillen; schon daraus geht hervor, dass sie nicht nur die Kerne färbt. Sie eignet sich sowohl für Schnitte als auch zum Durchfärben.

253. Hämacalcium nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1891 p. 182): Hämateïn (oder Hämateïn-Ammoniak) 1 g, Chloraluminium 1 g, Chlorcalcium 50 g, Eisessig 10 ccm (oder Essigsäure von 50 % 20 ccm), Alkohol von 70 % 600 ccm. Man reibt die beiden ersten Stoffe fein, löst sie in der Säure und dem Alkohol heiss oder kalt und setzt zuletzt das Chlorcalcium hinzu.

Das Gemisch ist roth violett; färbt es zu roth, so kann man dem durch Auswaschen mit einer 2 %igen Lösung von Chloraluminium in 70%igem Alkohol oder mit einer ½—1 %igen Lösung von Kaliumacetat in absolutem Alkohol abhelfen; gewöhnlich aber werden die Objekte schon durch das Waschen mit neutralem Alkohol violett oder blau.

Das Hämacalcium setzt nach einigen Monaten (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1892 p. 499) stark ab. Dem lässt sich einigermaassen dadurch begegnen, dass man sich zwei Gemische macht, jedes mit der Hälfte des Alkohols und der Säure, und das eine mit allem Chlorcalcium, das andere mit allem Chloraluminium und Hämateïn; man nimmt dann beim Gebrauche aus jeder Flasche gleich viel.

Bei manchen Objekten dringt das Hämacalcium nicht gut ein; man kann das vermeiden, indem man es ansäuert, oder besser noch die Objekte vor dem Färben einige Zeit in angesäuerten Alkohol legt. Ueberhaupt dürfen die Objekte n i c h t alkalisch reagiren. Wird hierauf geachtet, so ist das Ausziehen der Farbe mit saurem Alkohol nicht nöthig. Bei manchen Objekten (z. B. Hydroiden) dringt das Hämacalcium besser ein, wenn man es mit ⅛ seines Volumens an Glycerin verdünnt oder die Menge des Aluminiumchlorids (bis auf das 8fache) ehöht. — Das Hämacalcium färbt nicht so gut wie Hämalaun; überhaupt ist Mayer der Ansicht, kein alkoholisches Hämateïngemisch könne so distinkt färben, wie die wässerigen, und er empfiehlt das Hämacalcium auch nur als Ersatz des Kleinenbergschen Gemisches (§ 254), da es leichter anzufertigen und konstanter in seiner Wirkung sei. Denn es gibt ja Objekte, die keine wässerigen Färblösungen vertragen,

wenn sie einmal in Alkohol gewesen sind, und für solche eignet sich von den Karmingemischen besonders das Parakarmin, von den Hämateïngemischen das Hämacalcium. S. auch § 625 (Eisig).

Harris (Journ. Appl. Micr. Vol. 3 1900 p. 779) macht das Hämacalcium mit Hämatoxylin statt mit Hämateïn, indem er jenes mit Quecksilberoxyd oxydirt (s. oben § 248).

254. Kleinenbergs Hämatoxylingemisch (Foster & Balfour, Elements of Embryology 1874 p. 248; Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 19 1879 p. 208). Wenig rationell und konstant in Zusammensetzung und Wirkung; s. die Kritik von Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1891 p. 174) und Squire (Methods p. 25), ferner die Formeln von Squire (l. c.) und Wistinghausen (Mitth. Z. Stat. Neapel. 10. Bd. 1891 p. 41).

255. Eine Menge veralteter Formeln zur Bereitung von „Hämatoxylinen", d. h. Gemischen, die Hämateïn und ein Thonerdesalz enthalten, findet man in den früheren englischen Auflagen dieses Buches.

B. Andere Verbindungen des Hämateïns oder Hämatoxylins.

256. Allgemeines. Für die Mikrotechnik kommen einstweilen von den Verbindungen des Hämateïns ausser mit Aluminium ernstlich nur die mit Eisen, Kupfer und Chrom in Betracht. Heidenhain (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 199) hat auch Magnesium, Strontium etc. sowie viele Schwermetalle ohne Erfolg versucht. Von jenen Verbindungen sollen die, welche ausschliesslich oder hauptsächlich zur Untersuchung der Nerven im Gebrauch sind (Methode von Weigert etc.), dort besprochen werden, hier dagegen nur die von allgemeiner Anwendbarkeit. Die Färbungen mit Hämatoxylin-Eisen (§ 260 und 261) eignen sich nur für Schnitte; die mit H.-Chrom (§ 257 und 258) auch zum Durchfärben. S. auch oben § 249 die Angaben von Böhmer.

In der Regel geht man bei allen diesen Färbungen vom Hämatoxylin aus; mit Recht, denn es oxydirt sich, wie Mayer (Anat. Anzeiger 13. Bd. 1897 p. 318) gezeigt hat, in Kontakt mit den Lösungen von Eisen etc. noch über die Stufe des Hämateïns hinaus. Alle hier näher zu erörternden Methoden basiren übrigens auf der adjektiven Färbung (s. oben § 207), und meist dient als Beize eins der genannten Metallsalze, jedoch in den Verfahren mit Chromaten das Hämatoxylin. — S. hierüber auch Benda (Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1900 p. 174), der aus Anlass einer Kritik des Buches von Fischer (Fixirung etc.) die »complizirten und vieldeutigen Beizlackverfahren« und speziell die Methoden von Benda und M. Heidenhain kurz bespricht.

257. Hämatoxylin-Chrom nach HEIDENHAIN (Arch. Mikr. Anat. 27. Bd. 1886 p. 383). Man legt die Objekte 12—24 Stunden lang in eine $^1/_3$ % ige Lösung von Hämatoxylin in destillirtem Wasser, bringt sie dann auf eben dieselbe Zeit in eine $^1/_2$ % ige Lösung von Kaliummonochromat, die man nach Bedarf mehrere Male erneuert, und wäscht den Ueberschuss des Chromates mit Wasser aus. — Ursprünglich (ibid. 24. Bd. 1885 p. 468) nahm Heidenhain eine stärkere Lösung von Hämatoxylin ($^1/_2$—1 %) und Kaliumbichromat, aber die Kernfärbung war nicht so scharf. — Am besten färben sich die Objekte, wenn sie mit Alkohol oder Pikrinsäure fixirt worden sind, aber die mit Chromsäure fixirten färben sich auch, wenn sie vorher gut ausgewaschen worden sind, ebenso die mit Flemmings Gemisch fixirten.

Die Farbe ist schwarz bis grau, scharf und sehr reich abgestuft, sowohl für das Plasma als auch für die Kerne. Die Methode eignet sich zum Durchfärben. Man kann die Objekte nach Belieben durch längeres Belassen im Chromate entfärben. Wäscht man hingegen mit Alaun aus, so erhält man eine blaue Färbung.

258. Hämatoxylin-Chrom nach APÁTHY (Mitth. Z. Stat. Neapel 7. Bd. 1887 p. 744; etwas anders in: Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 47. Diese Methode unterscheidet sich von der vorigen dadurch, dass nur Alkohol von 70 bis 80 % zur Verwendung kommt: die Objekte gelangen zuerst in eine 1 % ige Lösung von Hämatoxylin und dann entweder halb so lange (wenn es Schnitte von 10—15 μ sind) oder doppelt so lange (Schnitte von 25—40 μ) in eine 1 % ige Lösung von Kaliumbichromat. Letztere Lösung macht man sich durch Vermischen einer 5 % igen wässerigen Lösung mit dem Vierfachen von 80—90 % igem Alkohol, und zwar unmittelbar vor dem Gebrauch, schützt sie auch sammt den Objekten darin vor dem Licht und erneuert sie mehrere Male. Ausgewaschen werden die Objekte ebenfalls im Dunkeln in 70 % igem Alkohol. Die Färbung soll durchsichtiger ausfallen, und die Objekte sollen mehr geschont werden als bei der Methode von Heidenhain.

Aehnlich verfährt PLATNER (Arch. Mikr. Anat. 33. Bd. 1889 p. 126).

Celloidinschnitte behandelt APÁTHY (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 170) 10 Minuten mit der Hämatoxylinlösung, trocknet sie mit Fliesspapier ab und bringt sie im Dunkeln auf 5—10 Minuten in Alkohol von 70 %, dem nur einige Tropfen der 5 % igen Lösung von Kaliumbichromat zugesetzt worden sind. Die Schnitte werden stahlblau bis stahlgrau; ohne das Abtrocknen würde sich das Celloidin mitfärben.

259. Hämatoxylin-Chrom nach HENNEGUY (Journ. Anat. Phys. Paris 27, Année 1891 p. 398). Nach der Färbung wird mit Kaliumhypermanganat differenzirt. Genaueres s. unten § 275.

260. Hämatoxylin - Eisen nach BENDA. Ursprünglich behandelte BENDA (Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1886 p. 564) die Objekte nach einander mit „schwefelsaurem Eisenammonium", Hämatoxylin und Chromsäure, erhielt aber Präzipitate von Eisenoxyd in den Geweben und verfährt daher jetzt (Verh. Anat. Ges. 7. Vers. 1893 p. 161; Zeit.

Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 69) wie folgt. Die Schnitte von beliebig konservirten Objekten kommen auf 24 Stunden in Liquor ferri sulfurici oxydati Pharm. Germ., verdünnt mit dem Doppelten an Wasser, werden gut ausgewaschen (erst mit destillirtem, dann mit gewöhnlichem Wasser) und gelangen dann in eine 1 %ige wässerige Lösung von Hämatoxylin, worin sie schwarz werden müssen. Dann werden sie wieder gewaschen und differenzirt: entweder in 30 %iger Essigsäure, wobei man aber aufpassen muss, oder in schwächerer Essigsäure oder in stark (1:20) verdünntem Liquor ferri sulf. oxyd. — Siehe auch die nicht wesentlichen Bemerkungen von Eisen (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 199).

Die Methode soll sich für allerlei Organe eignen und besonders gut die Axencylinder und die achromatischen Kernfiguren bei der Mitose färben; die letzteren mag man ausserdem mit Säurefuchsin oder Bordeauxroth nachfärben. Ich (Lee) finde nach sorgfältigem Vergleiche (Schnitte durch dasselbe Objekt dicht hinter einander, Vorbehandlung nach Benda und Heidenhain gleich lang, Färbung in derselben Hämatoxylinlösung), dass die Färbung nach Benda genau so ausfällt, wie die nach Heidenhain (§ 261). Ueberdies hält sich der Liquor ferri viel besser als Heidenhains Eisenalaun.

Der Liquor Ferri soll nach der 2. Ausgabe der Pharmakopoe (1882) 10 % Eisen enthalten. Man geht aber am Einfachsten von einer 10 %igen wässerigen Lösung von Eisenoxydsulfat aus, die sich Jahre lang auch am Licht unverändert hält, und probirt sich für seine Objekte die passende Stärke der Beize aus (Mayer).

261. Hämatoxylin-Eisen nach Heidenhain (Festschr. Kölliker Leipzig 1892 p. 118; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1891 p. 204). Man bringt die Schnitte $^1/_2$ bis höchstens 3 Stunden lang in eine $1\,^1/_2$—4 %ige Lösung von Eisenalaun (schwefelsaurem Eisenoxyd-Ammoniak, in klaren violetten Kristallen; das grüne Oxydul-Doppelsalz taugt dazu nicht; die Kristalle dürfen nicht gelb und angelaufen aussehen, auch darf man die Lösung nicht erwärmen, s. Arch. Mikr. Anat. 43. Bd. 1894 p. 435). Dann wäscht man sie mit Wasser ab, legt sie auf $^1/_2$ Stunde in eine etwa $^1/_2$ %ige Lösung von Hämatoxylin, wäscht sie wieder und bringt sie zur Differenzirung von Neuem in die Eisenlösung. Von Zeit zu Zeit werden sie herausgenommen, in Leitungswasser gelegt und unter dem Mikroskop besehen; sind sie gut differenzirt, so wäscht man sie in fliessendem Wasser wenigstens $^1/_4$ Stunde, höchstens 1 Stunde lang und führt sie in Balsam über.

Heidenhain gibt an, dass je nach der Länge der Bäder die Resultate verschieden ausfallen: sind die Schnitte in jedem nur etwa 1/2 Stunde gewesen, so werden sie blau, und zwar sind alle Bestandtheile der Kerne sehr intensiv und hoch differenzirt gefärbt; dauerten die Bäder aber 12—18 Stunden, und war die Differenzirung ebenfalls langsam, so werden sie schwarz, und dann sind auch viele andere Bestandtheile der Zelle sehr dunkel gefärbt.

Diese Methode ist gleich der von Benda (§ 260) auf das Wärmste zu empfehlen: beide differenziren nicht nur das Plasma, sondern gewähren auch bei gutem Gelingen so scharfe Bilder der chromatischen Bestandtheile des Kerns, dass diese stärkere Linsen vertragen als bei Färbung mit Hämalaun oder Gentianaviolett. — Allerdings muss man in der Deutung der Bilder sehr vorsichtig sein (s. oben p. 144 Boveri und Fischer). Die Objekte dürfen auch hier in Alkohol, Sublimat, Pikrinessigsäure etc. konservirt sein.

Die Eisenalaunlösung setzt auch im Dunkeln innen ans Glas stark ab, bleibt aber trotzdem brauchbar.

Ueber die Vorfärbung mit Bordeauxroth s. § 639.

Neuerdings (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 186) gibt Heidenhain etwas andere Anweisungen zum obigen Verfahren, speziell mit Rücksicht auf die Färbung seiner Centralkörper. Die Schnitte sollen absolut gleichmässig und höchstens 6 μ, lieber aber 3 μ dick sein und mit Wasser aufgeklebt werden. Die Eisenlösung ist $2\frac{1}{2}\%$ig und soll 6—12 Stunden wirken, und statt der frischen Hämatoxylinlösung muss eine wenigstens 4 Wochen alte (1 g Hämatoxylin, 10 ccm Alkohol [wie stark?], 90 ccm Wasser) verwandt werden, die also reichlich Hämateïn enthält; diese nimmt man so lange, bis sie total verdorben ist, denn sie wird durch steten Gebrauch immer besser, lässt die Schnitte 24—36 Stunden darin, differenzirt sie dann in der Eisenlösung und bringt sie durch die Alkohole und Xylol (ja keine ätherischen Oele!) in Xylolbalsam. Die Waschungen beim Uebertragen der Präparate aus einem Bade ins andere etc. müssen sehr sorgfältig sein.

Mayer (Anat. Anzeiger 13. Bd. 1897 p. 318) zeigt, dass zwar im Hämalaun und den analogen Gemischen ausser der Thonerde Hämateïn vorhanden ist, in dem Heidenhainschen Gemische dagegen eine noch höhere, unbekannte Oxydationstufe des Hämatoxylins. — R. Krause (Arch. Mikr. Anat. 45. Bd. 1895 p. 94) setzt der Hämatoxylinlösung 3—5% einer 1%igen Lösung von Kaliumhypermanganat zu, oxydirt also das Hämatoxylin, und färbt mit Rubin S in 90%igem Alkohol nach (auf 30 ccm 1 Tropfen konzentr. wässeriger Lösung). — Nach Held (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. Suppl. 1897 p. 277) färbt man mit Hämatoxylineisen besser, wenn der Hämatoxylinlösung von vornherein so viel Eisenalaun zugesetzt wird, dass „kein nennbarer Niederschlag bleibt“.

Francotte (Arch. Z. Expér. (3) Tome 6 1898 p. 200) beizt die Objekte mit Eisentartrat, nimmt aber zum Ausziehen Eisenalaun.

Peter (Arch. Mikr. Anat. 53. Bd. 1898 p. 183) verwendet für die Lösungen nur Alkohol und wäscht auch mit Alkohol aus.

Haemers (Bibliogr. Anat. Paris Tome 9 1900 p. 1) imprägnirt die Objekte in toto 2—8 Tage lang mit dem Eisenalaun (5%ige Lösung) und bringt sie nach flüchtigem Abwaschen auf 4—8 Tage in die 1%ige Hämatoxylinlösung, die er 2 oder 3 Mal erneuert. Zum Schluss wäscht er sie gründlich und führt sie in Paraffin über.

Hickson (Nature Vol. 62 1900 p. 589) nimmt statt des Hämatoxylins Brasilin.

262. Hämatoxylin-Eisen nach Bütschli (Untersuch. Mikr. Schäume 1892 p. 80; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 197). Die Schnitte kommen nach einander in eine schwache Lösung von Eisenacetat, in Wasser und in eine 1/2 %ige Lösung von Hämatoxylin. Sie werden ganz tief braunschwarz oder blauschwarz. Die Methode, von B. für äusserst dünne Schnitte von Protozoen angewandt, ist nicht allgemein brauchbar.

263. Hämatoxylin-Eisen nach Weigert (Allg. Zeit. Psychiatrie 50. Bd. 1894 p. 245) zum Färben der Mitosen im Centralnervensystem. Schnitte durch Material, das in 96%igem Alkohol fixirt und ohne Einbettung geschnitten worden ist, legt man auf 1/2 Stunde in Tinct. Ferri acet. Rademacheri, spült sie in Wasser ab, bringt sie auf 1/2 Stunde in Weigerts Hämatoxylinlösung (1 g Häm., 10 ccm Alkohol, 100 ccm Wasser), spült sie wieder ab, differenzirt sie rasch in saurem 70%igem Alkohol (1% Salzsäure), spült sie nochmals ab und schliesst sie entwässert in Balsam ein.

264. Hämatoxylin-Eisen nach Janssens (La Cellule Tome 14 1898 p. 207). Janssens ersetzt im Delafieldschen Gemisch (oben § 250) den Alaun durch Eisenalaun. Diese „hématoxyline noire“ ist nach mir (Mayer) vielleicht für den speziellen Zweck (Färbung der Kerne in den Hefezellen) brauchbar, sonst aber unnöthig stark und natürlich nur wenig haltbar.

265. Hämatoxylin-Kupfer nach Benda (Arch. Mikr. Anat. 30. Bd. 1887 p. 49). Die Schnitte von Material, das in Flemmings Gemisch konservirt worden ist, kommen in eine konzentrirte Lösung von Kupferacetat (24 Stunden lang bei 40° C., sonst 48 Stunden) und dann nach gutem Auswaschen mit Wasser auf einige Minuten in eine 1%ige wässerige Lösung von Hämatoxylin, wo sie dunkelgrau bis schwarz werden. Entfärbt werden sie bis zu hellgelb in 1/5%iger Salzsäure und gelangen zur Entfernung der Säure wieder in die Kupferlösung, wo sie blaugrau werden; dann werden sie gewaschen, entwässert und in Balsam eingeschlossen. (S. hierzu Piersol in: Amer. Month. Micr. Journ. Vol. 8 1887 p. 154; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 499). Die Methode soll sich besonders zum Studium der Spermatogenese eignen, ist aber jetzt wohl überflüssig.

266. Hämatoxylin-Molybdän. Mallory (Anat. Anzeiger 6. Jahrg. 1891 p. 375) färbt die Schnitte in einem alten Gemisch von 1 Theil Hämatoxylin, 6—10 Theilen Chloralhydrat, 1 Theil 10%iger Phosphormolybdänsäure und

100 Theilen Wasser. Hauptsächlich für das Nervensystem. S. auch SCHIEFFERDECKER & VOBIS in: Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 341. — RIBBERT (*Centralbl. Allg. Path. 7. Bd. 1896 p. 247; Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1898 p. 93) wendet die Methode auch für Bindegewebfibrillen an, beizt aber die Schnitte noch besonders mit der Phosphormolybdänsäure.

267. Andere Hämatoxylingemische. HERMANN (Arch. Mikr. Anat. 37. Bd. 1891 p. 583) behandelt zur Färbung des Zellplasmas seine Objekte erst in toto mit Hämatoxylin in alkoholischer Lösung und differenzirt dann die Paraffinschnitte nach Pal mit Kaliumhypermanganat etc. (s. § 703); da er aber zur Fixirung sein Platinosmiumgemisch (§ 72) verwendet, so ist nicht klar, welches der beiden Metalle hier als Basis für die Färbung dient. Er färbt überdies mit Safranin nach.

GUIGNARD (Ann. Sc. N. Bot. (7) Tome 14 1891 p. 167) beizt Material, das mit Alkohol fixirt ist, mit einer 10%igen Lösung von Zinksulfat und erhält dann mit Hämatoxylin eine Färbung, die sich nicht unverändert in Balsam überführen lässt.

MAYER (Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd. 1899 p. 205) hat mit Hämatoxylin, das in Magnesiawasser (§ 225) gelöst ist, ebenfalls nur wenig haltbare Färbungen bekommen.

MALLORY (*Journ. Exp. Med. Vol. 2 1897 p. 531) nimmt als Basis Wolfram (Phosphorwolframsäure 1%ig 1000 ccm, Hämatoxylin 1 g), HEIDENHAIN (s. Cohn in: Anat. Hefte 1. Abth. 5. Bd. 1895 p. 302) Vanadium (wässerige Lösungen von Hämatoxylin und Ammoniumvanadat).

---

13. Kapitel.

Allgemeines über Theerfarbstoffe.

268. Basische, saure und neutrale Theerfarbstoffe. Nach einem Prinzipe, das von Ehrlich (Zeit. Klin. Med. 1. Bd. 1880 p. 555) in die Histologie eingeführt wurde, theilt man gewöhnlich die Theerfarbstoffe in basische, saure und neutrale. Unter einem basischen Farbstoff versteht man einen solchen, worin das färbende Prinzip als Base mit einer farblosen Säure verbunden ist; z. B. das Fuchsin (Magenta) = salzsaures Rosanilin verdankt seine färberischen Eigenschaften nicht der Salzsäure, sondern dem Rosanilin. In einem sauren Farbstoff ist das färbende Prinzip eine Säure oder wirkt als solche; so ist z. B. das Säurefuchsin das Natron- (oder Ammoniak-)salz der Rosanilintrisulfosäure und verdankt seine Färbkraft nicht der Basis, sondern der Rosanilintrisulfosäure. Ferner ist das pikrinsaure Ammoniak in Ehrlichs Sinn ein saurer Farbstoff. Neutral ist nach Ehrlich z. B. das pikrinsaure Rosanilin; solche Verbindungen, die also durch Mischung von sauren und basischen (z. B. von Säurefuchsin und Methylenblau) Farbstoffen entstehen, sind allerdings gewöhnlich in Wasser unlöslich und fallen daher beim Mischen aus, lösen sich aber im Ueberschuss des sauren Farbstoffes wieder.

Die Bezeichnung eines nicht sauer reagirenden chemischen Körpers, wie z. B. des Ammoniumpikrates, als eines sauren Farbstoffes führt leicht irre; leider ist aber in zahlreichen Schriften diese Nomenklatur so verbreitet, dass einstweilen mit ihr gerechnet werden muss.

Ehrlich & Lazarus (Anämie 1. Abth. Wien 1898 p. 26) geben als zur Herstellung neutraler Farbstoffe besonders geeignet an von basischen: Methylgrün, Methylenblau, Amethystviolett (Tetraäthylphenosafranin), weniger Pyronin und Rhodamin; von sauren: Säurefuchsin, Orange G und Narceïn (Bisulfitverbindung des β-Naphthol-Orange). Einfache neutrale Gemische, die einen Komponenten gemeinsam haben, lassen sich ohne Weiteres mit einander verbinden; so gelangt man zu Kombinationen von 1 sauren und 2 basischen Farbstoffen oder umgekehrt, z. B. zum Triacidgemisch von Ehrlich (§ 316). — Ueber die Verbindung von Eosin mit Methylenblau s. unten § 326 (Rosin).

Nach Ehrlich sind die basischen Farbstoffe im Allgemeinen Kernfarbstoffe, d. h. sie haben eine besondere Affinität zum sogenannten Chromatin der Kerne und geben daher meist eine scharfe Kernfärbung. Die sauren hingegen sind nach ihm meist Plasmafarbstoffe, d. h. sie haben eine besondere Affinität zum Cytoplasma und zu den Intercellularsubstanzen. Endlich zeigen die neutralen Farbstoffe spezielle Affinität zu gewissen Bestandtheilen der Zelle, und unter ihnen befinden sich einige sehr wichtige Farbstoffe für die Zellgranula.

Indessen ist diese allgemeine Klassifikation der Theerfarbstoffe doch mit einigen Erläuterungen und Einschränkungen zu versehen. Denn in der Praxis haben wir nicht nur die Affinität eines Farbstoffes zu dem oder jenem Elemente der Zelle in Betracht zu ziehen, sondern müssen auch auf die Resistenz der Färbung gegen die Media zum Auswaschen, Entwässern und Uebertragen in Balsam achten. Dies ist aber besonders wichtig bei den Theerfarbstoffen, denn gerade sie dienen ja zur regressiven Färbung von Schnitten, die nachher durch Alkohol hindurch in Balsam kommen sollen. Ehrlich nun hat bei seinen Experimenten mit sogenannten Deckglaspräparaten von isolirten Zellen (aus Blut und Lymphe) hierauf keine Rücksicht genommen, und daher entsprechen seine beiden Kategorien (basische und saure Farbstoffe) durchaus nicht genau den Kern- und Plasmafarbstoffen.

So ist z. B. Orange ein saurer Farbstoff, tingirt aber, wie schon Flemming (Arch. Mikr. Anat. 19. Bd. 1881 p. 323) angibt, gleich dem basischen Safranin bei regressiver Färbung das Chromatin sehr scharf, darf also nicht ausschliesslich als Plasmafarbstoff gelten. Ferner ist Säurefuchsin sauer, tingirt aber regressiv zuweilen das Chromatin sehr kräftig. Safranin ist ein basischer Farbstoff, lässt sich aber mit geeigneten Beizen als Plasmafarbstoff benutzen. Auch Methylenblau ist basisch, geht aber bekanntlich bei der sogenannten intravitalen Färbung der Nerven wesentlich an das Plasma, während sich dabei die Kerne nebenher mehr zufällig tingiren. Endlich ist Nigrosin ein saurer Farbstoff, liefert aber bei ähnlicher Anwendung wie das Safranin eine kräftige Kernfärbung und tingirt dann das Cytoplasma nur schwach. Und das saure Bordeaux färbt Chromatin und Cytoplasma gleich gut.

269. Progressive und regressive Färbung mit Theerfarbstoffen. Nur sehr wenige Theerfarbstoffe, z. B. Methylgrün, Bismarckbraun und Toluidinblau geben, progressiv oder direkt (s. p. 138) angewandt, eine scharfe Kernfärbung, andere, z. B. Safranin, Gentianaviolett und Dahlia färben zwar bei Zusatz von Essigsäure in frischen Geweben die Kerne, sind aber in fast allen Fällen hierzu nicht so geeignet wie jene,

Auf der anderen Seite geben nur wenige Theerfarbstoffe eine reine Plasmafärbung, also ohne die Kerne zu tingiren. Die meisten färben diffus, aber hieraus resultirt dann in einigen Fällen durch die regressive oder indirekte Methode (s. p. 139) eine scharfe und prächtige Kernfärbung.

Hier möge zunächst die regressive Methode behandelt werden, indess die Kernfarbstoffe im nächsten und die Plasmafarbstoffe im 16. Kapitel zur Erörterung kommen sollen.

Allgemeine Winke für die regressive Färbung mit Theerfarbstoffen.

Das Prinzip dieser Methode verdankt man E. Hermann (1875) und A. Böttcher (1869), aber sie ist allgemein als die Methode von Flemming bekannt, der sie in ihren Einzelheiten bedeutend verbessert hat (Arch. Mikr. Anat. 19. Bd. 1881 p. 317 und 742).

270. Färben. Nur Schnitte oder Material, das so dünn ist, wie diese, z, B. Membranen, können regressiv gefärbt werden. Die Farbbäder macht man je nach der Löslichkeit des Farbstoffes mit Alkohol, Wasser oder Anilin; sie mit Alkohol zu machen, wenn Wasser genügt, scheint keinen besonderen Zweck zu haben; die Hauptsache dabei ist, die Lösungen möglichst konzentrirt zu machen. In der That sind auch die mit starkem Alkohol nicht ganz so gut wie die mit Wasser oder mit Alkohol von 50 %. Die Schnitte müssen sehr sorgfältig gefärbt werden, ja, man kann sie in der Regel nicht zu lange färben: bei den starken Lösungen in Anilin genügen zwar häufig einige Minuten bis ½ Stunde, um aber ganz sicher zu gehen, thut man oft gut daran, 12—24 Stunden lang zu färben. Bis zu einem gewissen Grade widerstehen nämlich die Schnitte dem Auswaschen um so mehr, je länger sie gefärbt waren, und das ist ein Vortheil. Bei Untersuchungen auf Kerne sollte man die Lösungen in Anilin nur für Material verwenden, das in Chromosmiumessigsäure gut fixirt ist, denn das basische Anilin mag sonst leicht das Chromatin angreifen.

In Chromosmiumgemischen fixirte Objekte geben eine schärfere und elektivere Färbung als die in Sublimat etc. fixirten. Während des Färbens werden die Gewebe überfärbt und müssen nun durch Entfernung der überschüssigen Farbe differenzirt werden.

271. Differenziren. Dies geschieht gewöhnlich durch Alkohol, der entweder neutral oder mit Salzsäure angesäuert ist. Sind die gefärbten

Schnitte lose (Celloidinschnitte), so bringt man sie in ein Uhrglas voll Alkohol, sind sie aufgeklebt, in einen Tubus voll Alkohol (dies ist besser als das blosse Uebergiessen damit). In beiden Fällen aber thut man gut daran, die Schnitte vorher mit Wasser abzuspülen oder sogar gut zu waschen.

Im Alkohol sieht man nun die überschüssige Farbe aus den Schnitten in Wolken oder Streifen ausströmen, erst rasch, dann langsamer. Zuletzt kommt der Moment, wo sie gerade aufhören will, zu strömen; die Schnitte sind blass und ziemlich durchsichtig, und, wenn es sich um Chromosmium-Objekte handelt, ändern sie auch ihre Farbe, indem nun ihre Grundfarbe zum Vorschein kommt (z. B. bei Verwendung von Safranin gehen sie von Dunkelroth in zartes Purpurn über). Jetzt ist die Differenzirung beendet, und das weitere Auswaschen mit Alkohol muss sofort unterbrochen werden (s. § 273).

Allgemein wird angegeben, man solle zum Differenziren absoluten Alkohol nehmen, indessen reicht 95 $^0/_0$iger meist völlig aus.

Der saure Alkohol zieht die Farbe viel rascher aus den ruhenden Kernen als aus den Mitosen aus, und das ist je nachdem ein Vortheil oder ein Nachtheil. Er darf nur selten mehr als $^1/_{1000}$ Salzsäure enthalten, eher weniger. Für den Anfänger gelte daher ungefähr als Richtschnur, dass man mit neutralem Alkohol auswäscht, wenn die ruhenden Kerne und die Mitosen gleich gut gefärbt werden sollen.

Eine gute Differenzirung dauert in der Regel nur zwischen $^1/_2$ und 2 Minuten; jedenfalls geht sie mit saurem Alkohol viel rascher vor sich als mit neutralem, ist daher auch riskanter.

272. Substitution. Ausser der Differenzirung durch Alkohol gibt es die für die Praxis wichtige und zugleich theoretisch interessante Methode des Differenzirens mit Hülfe eines anderen Theerfarbstoffes. So werden z. B. Methylenblau und Gentianaviolett aus den Schnitten durch eine wässerige Lösung von Bismarckbraun oder Eosin entfernt, ebenso Fuchsin durch Methylenblau. Der zweite Farbstoff substituirt sich dem ersten in der Grundfärbung der Gewebe, und so bleiben, wenn alles in Ordnung verläuft, die Kerne mit dem ersten Farbstoff gefärbt, während der zweite als Kontrastfarbe wirkt.

Resegotti (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 320) färbt Schnitte von Objekten, die in absolutem Alkohol fixirt waren, mit Methylviolett oder Dahlia und wäscht sie mit einer sehr verdünnten alkoholischen Lösung von Eosin oder Säurefuchsin aus. Wie weit aber hier eine wirkliche Substitution vorliegt, bliebe noch zu untersuchen.

273. Uebertragen in Balsam. Hat man die Differenzirung richtig beendet (s. § 271), so kann man das weitere Ausziehen des Farbstoffes

durch Eintauchen der Schnitte in Wasser verhindern; gewöhnlich aber bringt man sie sofort durch ein Intermedium in Balsam.

Als Intermedium kann man Nelkenöl nehmen, das allerdings noch etwas Farbe auszieht, oder ein Mittel, das die Farbe nicht angreift, wie Cedernöl, Bergamottöl, Xylol, Toluol; s. § 131. Hat man mit neutralem Alkohol differenzirt, so nimmt man am besten Nelkenöl, da jener nach sehr langer Färbung doch das Plasma nicht immer völlig entfärbt. Sonst jedoch, und speziell nach saurem Alkohol, braucht man es besser nicht, da es den Glanz der Farbe etwas schwächt. Aber es hilft die Mitosen differenziren, denn es entfärbt die ruhenden Kerne rascher als die sich theilenden. Uebrigens sind nicht alle Farbstoffe in dieser Beziehung gleich empfindlich, auch hängt viel von der Güte des so oft verfälschten Nelkenöls ab; frisches entfärbt rascher als altes.

Die aufgeklebten Schnitte übergiesst man einfach mit dem Intermedium. Hat es genug gewirkt, so ersetzt man es direkt durch Dammar oder Balsam; war es aber Nelkenöl, so muss man dieses zuvor durch Xylol, Cedernöl etc. entfernen und darf erst dann das Harz verwenden. Chloroform vermeide man stets nicht nur als Intermedium, sondern auch zum Verdünnen oder Lösen des Balsams.

274. Allgemeine Resultate. Die Resultate hängen sehr von der Vorbehandlung der Gewebe ab. Waren diese in Flemmings starkem Gemisch lange fixirt, nach dem Färben mit saurem Alkohol behandelt und mit Nelkenöl aufgehellt, so sind (mit einigen speziellen Ausnahmen) nur die Nucleoli und das Chromatin der Mitosen gefärbt, das der ruhenden Kerne aber nicht. Waren sie hingegen weniger fixirt, etwa mit dem schwachen Gemisch, und mit neutralem Alkohol differenzirt, so ist auch das ruhende Chromatin gefärbt.

275. Beizen mit Kaliumhypermanganat nach Henneguy (Journ. Anat. Phys. Paris 27. Année 1891 p. 398). Die Schnitte (Fixirung in Flemmings starkem Gemisch 2—6 Stunden lang, oder auch in Sublimat, Perényis oder Kleinenbergs Gemisch, Alkohol etc.) werden 5 Minuten lang mit einer 1%igen Lösung von Kaliumhypermanganat behandelt, dann mit Wasser gewaschen und mit Safranin, Rubin, Gentianaviolett, Vesuvin etc. gefärbt (nur halb so lange, wie man sie ohne Beize gefärbt hätte); am besten nimmt man die Lösung von Safranin in Alkohol und Anilinwasser (§ 285). Darauf werden sie mit Alkohol differenzirt und wie gewöhnlich in Nelkenöl gebracht. Nun aber muss die weitere Entfärbung unter dem Mikroskope kontrolirt und im richtigen Augenblicke unterbrochen werden. Gewöhnlich geht sie langsam vor sich, und je langsamer, desto elektiver wird die Färbung. Häufig fährt sie noch fort, wenn die Schnitte schon in Balsam sind, besonders wenn das Nelkenöl vorher nicht

ganz sorgfältig entfernt worden war, und so können die Präparate 24 oder 48 Stunden nach dem Einschliessen in Balsam besser sein, als gleich zu Anfang.

Das Kaliumhypermanganat beizt so energisch, dass, wenn man es zu lange hat einwirken lassen, bevor man mit Safranin (oder gar mit Rubin) färbt, sich die Schnitte überhaupt kaum noch gut entfärben; mitunter muss man sie dann Monate lang in Nelkenöl liegen lassen.

Will man die Einzelheiten im Plasma besonders gut hervortreten sehen, so bringt man die Schnitte vor der Beizung mit Kaliumhypermanganat 10 Minuten lang in eine $^1/_2$ %ige Lösung von Hämatoxylin in 90%igem Alkohol, wäscht sie mit Wasser aus, behandelt sie 10 Minuten lang mit einer 2%igen wässerigen Lösung von Kaliumbichromat und wäscht sie wieder aus. Sind aber die Gewebe mit Flemmings Gemisch fixirt worden, so wird das kaum nöthig sein.

276. Beizen mit Formaldehyd. Nach Ohlmacher (*Med. News 16. Februar 1895) ist der Formaldehyd eine kräftige Beize für Theerfarbstoffe. Entweder beizt man die Schnitte vorher in einer 2—4%igen Lösung von Formol (Deckglaspräparate 1 Minute lang) oder verbindet das Beizen und Färben miteinander: zu 100 ccm 4%igem Formol setzt man entweder 1 g Fuchsin und 10 ccm absol. Alkohol oder 10 Theile einer gesättigten alkohol. Lösung von Gentianaviolett oder von Methylviolett 5 B; oder in den 100 ccm löst man 1 g Methylenblau auf. Die Schnitte färbt man darin $^1/_2$ Minute lang, und sie sollen dann dem Alkohol viel besser widerstehen, als wenn sie wie gewöhnlich gefärbt wären. Die entsprechende Lösung von Safranin O (von Grübler) soll genau dieselbe Plasmafärbung geben wie Eosin.

277. Beizen mit Tannin und Brechweinstein. Nach Rawitz (Sitzungsb. Ges. Nat. Freunde Berlin f. 1894 p. 174; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1895 p. 503; sein Leitfaden 2. Auflage 1895 p. 76) werden durch geeignete Beizen die Theerfarbstoffe, die für sich allein regressiv reine Kernfärbungen geben, zu reinen Plasmafarbstoffen. Schnitte von Material aus Chromgemischen (Flemmings Gemisch etc.) kommen auf 24 Stunden in eine kalt bereitete 20%ige Lösung von Tannin in Wasser, werden gut gewaschen, in eine 1—$2^1/_2$%ige Lösung von Brechweinstein gelegt (auf 2—4 Stunden bei 40° C. oder auf 24 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur), sorgfältig gewaschen, 24 Stunden lang gefärbt, dann differenzirt (entweder wie sonst auch in Alkohol oder 2—24 Stunden lang in einer $2^1/_2$%igen Lösung von Tannin) und zuletzt wie gewöhnlich in Balsam gebracht. Zum Färben können dienen Safranin, Fuchsin, Methylviolett, Gentianaviolett oder Smaragdgrün (Tetraäthylgrün). In guten Präparaten zeigt sich eine Inversion der Färbung: das Chromatin ist ganz ungefärbt, dagegen sind Plasma und Intercellularsubstanzen gefärbt.

Rawitz macht selber darauf aufmerksam, dass sich nicht nur das Eiweiss, womit er die Schnitte aufklebt, sondern auch alle etwaigen Verunreinigungen des Objektträgers stark mitfärben. In der That ist, wie ich (Lee) finde, die Färbung so schmutzig wie nur möglich.

Ueber eine andere Art der Beizung s. unten § 343 und 880.

278. Wahl der Farbstoffe. Die Kernfarbstoffe sind so zahlreich, dass man glauben möchte, man käme bei der Auswahl in Verlegenheit. Für allgemeine Zwecke könnte man sich auch wohl an einem guten rothen und einem guten blauen genügen lassen, z. B. an Safranin und Thionin oder Gentianaviolett. Indessen für feinere Arbeiten ist es doch wohl erwünscht, noch eine oder zwei mehr zu haben, denn man muss auch die Art in Betracht ziehen, wie sich diese Farbstoffe bei der doch erwünschten Kombination mit Plasmafarbstoffen verhalten. Ferner geben einige Kernfarbstoffe eine etwas trübe Tinktion, sodass die Chromosomen und Nucleoli häufig ganz undurchsichtig erscheinen. Dies gilt z. B. von Gentianaviolett, nicht aber von Dahlia, das jenem sonst im Ton nahe kommt. Andererseits lassen Safranin und Methylgrün die Zellelemente ganz durchsichtig. Das ist bei dicken Schnitten und zuweilen auch sonst ein Vortheil, nur begünstigt diese Transparenz leider die Bildung von Diffraktionslinien, die bei feineren Arbeiten einer guten optischen Definition hinderlich werden können. Mithin gewähren die trüben Farben, z. B. Gentianaviolett, bei sehr dünnen Schnitten, und wenn es auf sehr genaue Definition des Chromatins ankommt, doch wieder einen Vortheil, während die transparenten oder halbtransparenten Farben, z. B. Safranin, sich besser für dicke Schnitte eignen. Auch kommt es mir (Lee) so vor, als wenn die blauen Farben, wie Gentianaviolett, für Untersuchungen bei künstlichem Lichte nicht recht vortheilhaft sind: sie geben mehr oder weniger dichroitische Bilder, die einer guten Definition im Wege stehen.

In Summa sei also Safranin als rother, Thionin oder Gentianaviolett als blauer Kernfarbstoff empfohlen, falls nicht spezielle Bedingungen (s. oben) eine andere Wahl anrathen.

Ueber die Wahl der Plasmafarbstoffe lässt sich nicht viel Allgemeines sagen, da hier ja fast Alles von dem Zweck abhängt, den man mit der Färbung des Plasmas oder seiner Theile verbindet. Sind die Kerne roth gefärbt, so wird man natürlich des Kontrastes halber ein kräftiges Blau oder Grün wählen; sind sie blau, ein Roth. Daraus resultiren dann gute Kombinationen, wie Safranin (oder Karmin) und Lichtgrün (oder Indigkarmin), oder Methylgrün (oder Hämateïnthonerde) und Eosin (oder Orange) etc.

Zum Stückfärben kann mit Vortheil von der grossen Schaar der Theerfarbstoffe wohl nur Bismarckbraun (§ 282) dienen, da alle anderen den bisher gebräuchlichen Arten des Auswaschens der Objekte,

noch mehr aber ihrer weiteren Behandlung bis ins Paraffin oder Celloïdin nicht Stich halten. Indessen möchten besondere Versuche nach dieser Richtung hin wohl nicht aussichtslos sein.

279. Haltbarkeit der Färbungen. Im Gegensatze zu den Färbungen mit Karmin (und verwandten Farbstoffen) und Hämatoxylin oder Hämateïn in Verbindung mit Thonerde, Eisen etc., die meist bei richtiger Behandlung sich in Harzen unbegrenzte Zeit zu halten scheinen, sind eine Anzahl der elektivesten und prächtigsten Färbungen mit Theerfarbstoffen leider dem Verderben in hohem Grade unterworfen. Dies gilt z. B. von den Dreifarbgemischen Ehrlichs, aber auch von deren Bestandtheilen, wenn sie einzeln angewandt werden: meist sind sie in Glycerin schon sehr bald, in Harzen wenigstens nach Jahresfrist, ja, oft schon oft nach Monaten verblichen. Nur Safranin, Gentianaviolett, Bismarckbraun und Pikrinsäure machen in dieser Beziehung eine rühmliche Ausnahme, und auch einige andere Theerfarbstoffe scheinen sich, obwohl sie sehr schnell ihr anfängliches Feuer einbüssen, doch in brauchbarer Stärke ziemlich zu halten.

Ungemein viel hängt hierbei von der Art der Vorbehandlung der Objekte ab. Sind sie ad hoc gebeizt worden, so nehmen sie nicht nur mehr Farbstoff auf als ohne Beizung, sondern halten ihn auch fester. (S. auch über die Färbung des Schleimes mit Safranin in § 800.)

Im Ganzen ergibt sich hieraus namentlich dem Anfänger die Regel, für Dauerpräparate nicht die Theerfarbstoffe zu benutzen. Wohl aber sind einige von diesen, besonders Thionin (und seine Verwandten), nützlich und bequem, um einen raschen Ueberblick über die Anordnung der Gewebe auf Schnitten zu bekommen. Zu diesem Zwecke färbt man letztere in ziemlich schwachen Lösungen und untersucht sie auch darin, also ohne sie auszuwaschen, bei weit geöffnetem Condensor.

14. Kapitel.

Färben der Kerne mit Theerfarbstoffen.

280. Allgemeines. Viele oder wohl die meisten Theerfarbstoffe tingiren die Kerne direkt mehr oder weniger rein, wenn die Lösungen mit Essigsäure vermischt werden. Eine in jeder Beziehung werthvolle direkte Färbung liefern aber nur Methylgrün und Bismarckbraun, ferner Thionin und Methylviolett. Die übrigen — und unter diesen ragen besonders Safranin und Gentianaviolett hervor — lassen nur eine indirekte (regressive) Färbung zu. Auf beiderlei Weise brauchbar ist z. B. Thionin (§ 284).

281. Methylgrün. Es ist das Chlorzinkdoppelsalz des Heptamethylpararosanilinchlorids und entsteht durch die Einwirkung von Chlor- oder Jodmethyl auf Methylviolett, enthält daher immer etwas unzersetztes Violett, soll auch zuweilen mit Anilinblau oder mit einem grünen Nebenprodukt verfälscht werden. Es ist äusserst empfindlich gegen Alkali, und deswegen darf man zum Färben, Auswaschen und Einschliessen nur ganz neutrale oder schwach saure Medien gebrauchen.

Nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 312) ist das Violett leicht durch Ausschütteln der wässerigen Lösung mit Chloroform zu ermitteln. Noch bequemer, wenn auch nicht so empfindlich, ist folgende Probe: man bringt einen Tropfen der Lösung auf Filtrirpapier und hält den grünen Fleck über eine offene Flasche mit Ammoniak; er darf nicht violett werden, sondern muss verschwinden.

In noch höherem Grade ist mit Methylviolett verunreinigt das Jodgrün, das etwas später als das Methylgrün in die Mikrotechnik eingeführt wurde (s. § 329). Auch die Sorte von Methylgrün, die Calberla (Morph. Jahrb. 3. Bd. 1877 p. 625) als der Erste anwandte („Vert en cristaux"), scheint viel Violett enthalten zu haben. Letzteres färbt übrigens das Plasma und, wenn es reichlich vorhanden ist, auch die Kerne, sodass diese nicht rein grün, sondern eher blau werden. Daraus haben dann Griesbach u. A. falsche Schlüsse über die Vorgänge beim Färben gezogen (s. hierüber Mayer, l. c.).

Auch Fischer (Fixirung etc. p. 89) warnt vor dem Methylviolett und benutzt für seine Untersuchungen eine Lösung von Methylgrün, die er zuvor durch Schütteln mit Amylalkohol vom Violett befreit hat.

Das Methylgrün dient hauptsächlich zum Färben der Kerne von frischen oder soeben erst fixirten Geweben. Hierzu verwendet man es in starker wässeriger Lösung unter Zusatz von etwa 1 % Essigsäure. Man wäscht mit Wasser aus, am besten mit angesäuertem, und schliesst in einem ebenfalls angesäuerten wässerigen Medium ein, das etwas Methylgrün gelöst enthält (s. unten).

Bei dieser Art der Anwendung ist das Methylgrün ein reiner Kernfarbstoff, d. h. es ist ein scharfes Farbreagens auf Chromatin. Denn im Kern färbt es nur das Chromatin, nicht auch seine übrigen Bestandtheile, und ausserhalb des Kerns färbt es nur einige Arten Zellplasma und geformte Bestandtheile, besonders Sekrete von Drüsen (z. B. Seide und Schleim). Aber das Chromatin wird unweigerlich hellgrün (Ausnahme das Nucleïn im Kopfe einiger Arten Sperma), während die anderen Elemente gewöhnlich blau oder violett werden, vielleicht weil sie die Beimischungen des Methylgrüns in sich aufnehmen.

Nach BURCHARDT (La Cellule Tome 12 1897 p. 364) färbt Methylgrün mit Essigsäure zwar in den frischen Kernen das Chromatin gut, nicht aber, wenn diese vorher mit Essigsäure fixirt sind. (Für Bismarckbraun gelte dasselbe.) Und während nach Fixirung mit reiner Sublimatlösung das Methylgrün das Chromatin sicher färbe, versage es, wenn man Sublimat mit Essigsäure angewandt habe.

Wenn FISCHER (Fixirung etc. p. 192) meint, unter den basischen Farbstoffen könne man „mit einem Schein von Berechtigung nur das Methylgrün als Kernfarbstoff" bezeichnen, so hat er, wie aus dem Obigen hervorgeht, völlig Recht. Denn einen Farbstoff, der ein wirkliches Reagens im Sinne der Chemiker auf das Chromatin wäre, kennt man noch nicht.

Ferner färbt auf diese Weise das Methylgrün augenblicklich und überfärbt nie; die Lösung dringt gut ein, tödtet die Zellen sofort, ohne sie zu schwellen oder sonst in der Form zu verändern, und erhält sie so wenigstens einige Stunden, darf daher als ein zartes Fixirmittel gelten. Auch lässt es sich, ohne auszufallen, mit mehreren Fixir- oder Konservirmitteln mischen, so mit $^1/_{10}$—1 %iger Osmiumsäure oder mit dem Gemisch von Ripart & Petit (§ 85), das sich übrigens auch gut zum Auswaschen und Einschliessen eignet.

Alkoholische Lösungen dienen ebenfalls zum Färben, indessen tingiren sie nach meiner (MAYER) Erfahrung die Kerne viel weniger stark als wässerige.

BÖHM & OPPEL (Taschenbuch 3. Aufl. 1896 p. 69) färben die Schnitte 10 Minuten lang mit einer Lösung von 1 Theil Methylgrün in 100 Theilen Wasser und 25 Theilen absol. Alkohol oder 24 Stunden lang in obiger Lösung, die mit

20 $^0/_0$ igem Alkohol auf wenigstens das doppelte Volumen verdünnt ist. — FRANCOTTE (Arch. Z. Expér. (3) Tome 6 1898 p. 196) verwendet als Lösemittel für Methylgrün allein oder im Verein mit anderen Farbstoffen (Säurefuchsin und Orange; oder auch für ein Gemisch von Bismarckbraun und Malachitgrün) ein Gemisch von je 15 Vol. Glycerin und 90 $^0/_0$ igem Alkohol und 70 Vol. Wasser unter Zusatz einer Spur Essigsäure. Hiermit färbt er die fixirten Eier von Polycladen durch; die Schnitte hingegen tingirt er mit Methylgrün (und Säurefuchsin), in absolutem Alkohol gelöst. Die Färbung sei dann zwar kapriziös betreffe aber stets nur das Chromatin.

Als Curiosum sei erwähnt, dass nach PAPPENHEIM (Arch. Path. Anat. 157. Bd. 1899 p. 25) das Chromatin sich stärker mit Methylgrün färbt, wenn man die Präparate vorher mit einer gesättigten wässerigen Lösung von Chlorophyll behandelt hat. — FISCHER (Fixirung etc. p. 93) räth zu demselben Zweck einen Zusatz von Borax an, erhält aber dann natürlich fast ganz diffuse Färbungen. — Ebenso MATHEWS (Amer. Journ. Phys. Vol. 1 1898 p. 452), der zum Färben des Zellplasmas die Lösungen von Methylgrün, Safranin, Thionin, Toluidinblau etc. mit etwas Natriumkarbonat versetzt.

Die Farbe hält sich nicht gut. Es ist schwer, die Präparate befriedigend in Balsam zu bringen, denn der Alkohol zieht die Farbe aus, falls er nicht selber ordentlich damit versehen wird; jedoch kann man dem einigermassen abhelfen (wenigstens wenn man das Methylgrün im Biondischen Gemisch verwendet), indem man nach Heidenhain die Schnitte vor dem Färben einige Minuten lang mit Jodtinktur behandelt (§ 317). Squire (Methods p. 38) sagt, tüchtiges Auswaschen mit Wasser nach dem Färben habe dieselbe Wirkung. Von den Präparaten, die man in den gebräuchlichen wässerigen Medien mit Ueberschuss an Farbstoff aufhebt, halten sich die besten auch nur wenige Monate. Nach brieflicher Mittheilung von Henneguy jedoch bleiben sie in Bruns' Gemisch (§ 419) gut.

Ueber die Verwendung des Methylgrüns als eines Kernfarbstoffes in Gemischen s. besonders § 316 u. 317.

282. Bismarckbraun (Manchesterbraun, Phenylenbraun, Vesuvin), ein Gemisch verschiedener Farbstoffe (hauptsächlich soll es Phenylendisazometaphenylendiamin enthalten), wurde von WEIGERT 1868 (Arch. Mikr. Anat. 15. Bd. p. 258) in die Mikrotechnik eingeführt, ist aber nie recht in Aufnahme gekommen, vielleicht wegen seiner unschönen Farbe, auf die schon Weigert aufmerksam gemacht hat. Es wird entweder in rein wässeriger Lösung benutzt, der man auch wohl etwas Essigsäure oder Osmiumsäure zusetzt, oder in alkoholischer Lösung (z. B. konz. wäss. Lösung mit $^1/_3$ Vol. Alkohol von 90 $^0/_0$ versetzt); gut zum Lösen ist ferner Calberlas Gemisch von Glycerin und Alkohol (§ 424)

oder verdünntes Glycerin (40—50 %); s. auch oben p. 190 (FRANCOTTE). Die wässerigen Lösungen müssen oft filtrirt werden; empfohlen hat man auch den Zusatz von Karbolsäure. S. auch p. 189 (BURCHARDT).

MAYER (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p 315) warnt vor dem öfteren Filtriren, da das Papier stets viel Farbe zurückhalte, wie dies nach SCHIEFFERDECKER (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 43) mit Methylgrün und Anilingrün der Fall sei. — Dagegen ist mir (MAYER) eine 1/3 %ige Lösung in 30 %igem Alkohol bereits 3 Jahre lang klar geblieben.

Bismarckbraun färbt sehr rasch, überfärbt aber leicht; die Farbe ist in Balsam und Glycerin haltbar. Hauptsächlich hat man es früher zum Durchfärben benutzt (z. B. BORN in: Morph. Jahrb. 5. Bd. 1879 p. 64), aber man kann es auch regressiv für Schnitte benutzen, indem man diese gründlich mit 90 %igem Alkohol auswäscht. Ausser den Kernen wird der Schleim stark tingirt, das Plasma hingegen meist wenig. Mitunter ist aber Auswaschen mit saurem Alkohol erforderlich.

HERLA (Arch. Biol. Tome 13 1893 p. 423) empfiehlt für die Eier von *Ascaris* ein Gemisch von 0,25 Vesuvin, 0,25 Malachitgrün, 10 Glycerin und 100 Wasser; Auswaschen mit verdünntem Glycerin.

Zur intravitalen Färbung ist Bismarckbraun (natürlich in ganz schwacher Lösung) zuerst von Brandt 1878 bei Süsswasser-Protozoen (s. unten § 874), später von MARTINOTTI (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 311) bei Kaulquappen und von MAYER bei Caprelliden (s. Fauna Flora Golf. Neapel 6. Monogr. 1882 p. 153) und alle möglichen anderen Seethiere (es dringt sogar bei Selachiern, die man darin leben lässt, in alle Gewebe ein) benutzt worden.

283. Metaphenylendiamin ist nach UNNA (Monatsh. Prakt. Derm. 6. Bd. 1887 No. 2) in wässeriger Lösung ein sehr guter graubrauner Kernfarbstoff. Setzt man zu der Lösung auf jede Messerspitze voll dieses Salzes einen Tropfen einer 1—5 %igen Lösung von Natriumnitrit, so entsteht sofort Bismarckbraun und ist ohne Weiteres zum Färben verwendbar.

284. Thionin. Das Thionin oder Lauths Violett steht chemisch dem Methylenblau nahe. Es scheint für die Industrie nicht mehr dargestellt zu werden, ist aber von Grübler & Hollborn, sowie von Klönne & Müller in Berlin und von E. Merck in Darmstadt zu beziehen (s. MAYER in: Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 314). Hoyer führte es zum Färben des Schleimes in die Technik ein (s. unten § 800), während HEIDENHAIN (Arch. Mikr. Anat. 43. Bd. 1894 p. 433) es für die Kerne empfahl.

Färbt man mit einer konzentrirten wässerigen Lösung einige Minuten lang, so wird kaum etwas ausser dem Chromatin tingirt sein (erst später nimmt auch das Plasma Farbe an); man braucht daher die Präparate nicht zu differenziren, sondern nur mit Wasser abzu-

spülen, zu entwässern und in Balsam einzuschliessen. Hat man dagegen stark tingirt, so differenzirt man wie gewöhnlich mit Alkohol; gegen diesen aber ist die Farbe so widerstandsfähig, dass man dabei gar nicht über das Ziel hinausschiessen kann: in einer Stunde zieht nicht mehr aus, als von Gentianaviolett oder Dahlia in einer Minute, mithin lässt sich der Prozess unter dem Mikroskope bequem kontroliren. Deshalb eignet sich das Thionin besonders für Anfänger (s. auch oben § 279). Es färbt sehr stark sowohl Präparate aus Sublimat als auch aus Flemmings Gemisch.

Marchoux (*Ann. Inst. Pasteur 1897) empfiehlt sehr das Thionine phéniquée de Nicolle, nämlich ein Gemisch von 1 Theil einer konzentrirten Lösung von Thionin in 50%igem Alkohol und 5 Theilen einer 2%igen wässerigen Karbolsäure. Letztere gehe darin eine chemische Verbindung mit dem Thionin ein, und daher sei die Lösung erst in einigen Tagen gut. Ich (Mayer) habe davon keine besonders guten Resultate erhalten.

Henneguy (in litt.) entwässert die gefärbten Objekte mit Aceton; da aber das Differenziren mit Alkohol so leicht geht, so wird man wohl nur in besonderen Fällen zum Aceton greifen. — Ueber eine Doppelfärbung mit Thionin und Pikrinsäure s. Sabrazès (C. R. Soc. Biol. Paris (10) Tome 4 1897 p. 51), mit Thionin und Rutheniumroth s. Eisen (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 200).

Die Färbungen verblassen in Balsam schon bald ganz erheblich. Nach Wolff (Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1899 p. 312) soll man, um dies zu umgehen, den Balsam nicht flüssig verwenden, sondern festen schmelzen und auf die Objekte träufeln. Diese Prozedur werden natürlich feinere Präparate nicht gut vertragen; ebenso wenig scheint mir (Mayer) zweckmässig das Verfahren von Félizet & Branca (Journ. Anat. Phys. Paris 34. Année 1898 p. 590), kein Deckglas aufzulegen.

Ueber die Färbung des Schleimes mit Thionin und die dabei auftretende Metachromasie s. unten § 800, über Plasmafärbung oben p. 190 (Mathews).

285. Safranin. Es wurde, wie es scheint, zuerst von E. Hermann (s. Flemming in: Arch. Mikr. Anat. 19. Bd. 1881 p. 320) benutzt und bildet jetzt einen der wichtigsten Farbstoffe, nicht nur, weil es sehr stark, feurig und dauerhaft färbt, sondern weil es sich auch den Kernen und den anderen Elementen der Gewebe gegenüber sehr verschieden verhält.

Das ganze Geheimniss beim Färben mit Safranin ist, ein gutes Safranin zu bekommen, und es sei daher hier dringend auf die Bemerkungen in § 212 verwiesen.

Es gibt wohl wenigstens 20 Sorten von Safranin zu kaufen, und sie unterscheiden sich beträchtlich von einander. Einige sind leicht löslich in Wasser, nicht aber in Alkohol, andere genau umgekehrt, wieder andere in beiden. S. hierüber auch Resegotti in: Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 320.

Die meisten Safranine sind nicht genug in Wasser löslich, man muss daher andere Mittel zur Lösung anwenden. Pfitzner (Morph. Jahrb. 6. Bd. 1880 p. 478; 7. Bd. 1882 p. 291) löst 1 Theil Safranin in 100 Theilen absol. Alkohol und setzt nach einigen Tagen 200 Theile dest. Wasser hinzu. — Flemming (Arch. Mikr. Anat. 19. Bd. 1881 p. 317) benutzt eine konzentrirte Lösung in absol. Alkohol, die er aber mit etwa halb so viel Wasser verdünnt hat. — Babes (Arch. Mikr. Anat. 22. Bd. 1883 p. 359) verwendet ein Gemisch von gleichen Theilen einer konzentrirten wässerigen und konzentrirten alkoholischen Lösung (sehr zu empfehlen) sowie eine konzentrirte oder eine übersättigte wässerige Lösung, die in der Wärme gemacht und bei 60° filtrirt worden ist, mithin auch warm benutzt wird, da sie in der Kälte Kristalle ausscheidet. — Auch rein wässerige Lösungen sind noch im Gebrauch. — Endlich löst Babes (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 470) Safranin (im Ueberschuss) in 2 Theilen Anilin und 100 Theilen Wasser; dies Gemisch muss auf 60—80° erwärmt und durch ein benetztes Filter filtrirt werden, es hält sich 1—2 Monate lang. — Zwaardemaker (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 212) mischt etwa gleiche Theile einer konzentrirten alkoholischen Lösung von Safranin und Anilinwasser (dies wird durch Schütteln von Wasser mit Anilin und Filtriren gewonnen); nach meiner (Lee) Erfahrung hält es viele Monate, vielleicht für immer. Ich benutze gewöhnlich gleiche Theile einer konzentrirten Lösung in absolutem Alkohol und einer solchen in Anilinwasser.

Alle genannten Gemische können nach irgend einer der gleich anzugebenden Methoden differenzirt werden, natürlich muss man aber mit den schwächeren länger färben. Ueber das Anilin dabei s. § 270.

Das Anilinwasser wurde zuerst 1882 von Ehrlich (*D. Med. Wochenschr. No. 19) empfohlen. Es soll etwa 3% Anilin enthalten.

Man differenzirt entweder mit neutralem oder mit saurem Alkohol (Flemming in: Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 350, und in: Arch. Mikr. Anat. 37. Bd. 1891 p. 249), je nachdem alles Chromatin oder nur das in den Mitosen gefärbt werden soll. Alkohol mit $^1/_{1000}$ Salzsäure ist dazu am besten. Die Voraussetzung dabei ist, dass die Objekte wenigstens 12 Stunden lang in Flemmings starkem Gemisch fixirt und einige Stunden lang gefärbt worden sind. — Podwyssozki (Beitr. Path.

Anat. Ziegler 1. Bd. 1886 p. 289; Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 405) färbt nur $^1/_2$ Stunde lang und bringt die Schnitte zum Differenziren auf einige Sekunden bis 2 Minuten in eine starke alkoholische Lösung von Pikrinsäure und dann erst durch absolut. Alkohol in Nelkenöl; die Farbe wird aber braun statt rein roth. — Babes empfiehlt nach der Färbung in Anilinwasser die Behandlung mit Jod nach Gram (§ 286); dasselbe thut Prenant (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 4. Bd. 1887 p. 368), meint aber, man müsse die Jodlösung etwas länger, den Alkohol etwas kürzer einwirken lassen als bei Gentianaviolett.

Garbini (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 170) entwässert die Schnitte nach dem Färben in Methylalkohol, der Safranin nur sehr wenig löst, und differenzirt sie in einem Gemisch von Nelkenöl (2 Theile) und Cedernöl (1 Theil). Mir (Lee) hat diese Methode keine guten Resultate ergeben. — S. auch die umständlichere Methode von Martinotti & Resegotti (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 328), sowie die noch schwierigere von Henneguy (C. R. Soc. Philomath. Paris 1896 No. 2: Beizung und Differenzirung der Schnitte mit Ammoniumrhodanat etc.).

Nach Ohlmacher (*Journ. Amer. Med. Ass. Vol. 20 1893 p. 111) können bei Behandlung der mit Safranin gefärbten Schnitte mit Jod oder Pikrinsäure in den Geweben Präzipitate auftreten.

Ueber Differenziren durch Substitution s. oben § 272, über Safranin zum Färben von Schleim (und die dabei auftretende Metachromasie) § 800, von Plasmazellen § 773, des Plasmas oben p. 190 (Mathews).

Safranin und Hämateïnthonerde. Foà (Festschr. Virchow 1891 p. 481; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 227) mischt zur Untersuchung von Knochenmark Böhmers Hämatoxylin 25 ccm, Safranin (die gewöhnliche 1%ige Lösung in Alkohol und Wasser) 20 ccm und Wasser 100 ccm. Er färbt die Schnitte darin 1—3 Minuten lang, wäscht sie dann aus und entwässert sie entweder sofort oder färbt sie erst noch mit einer schwachen Lösung von Pikrinsäure (oder auch von Orange).

Regaud (Verh. Anat. Ges. 14. Vers. 1900 p. 112) färbt die Schnitte erst mit Hämalaun, dann mit Safranin nach Zwaardemaker (s. oben) und differenzirt mit saurem Alkohol.

Rabl (Morph. Jahrb. 10. Bd. 1884 p. 217) färbt zuerst das Plasma mit sehr verdünntem Gemisch von Delafield 24 Stunden lang so hell, dass die Farbe allein gar nicht zu brauchen wäre, wäscht mit Wasser, dann mit saurem Alkohol, färbt mehrere Stunden lang in Pfitzners Safranin und wäscht mit neutralem Alkohol aus.

286. Gentianaviolett. Man braucht es in wässeriger oder in alkoholischer, mit etwa halb so viel Wasser verdünnter Lösung (Flemming, Zellsubstanz p. 384) und differenzirt mit neutralem oder mit angesäuertem (Flemming in: Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 350) Alkohol, wie beim Safranin.

In einer unnöthig komplizirten Weise verfährt BIZZOZERO (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 24). Er färbt die Schnitte mit dem Gemisch von Ehrlich (für Bakterien: Gentianaviolett 1 Theil, Alkohol 15, Anilin 3 und Wasser 80 Theile) und differenzirt sie abwechselnd mit schwacher wässeriger Lösung von Chromsäure und mit absolutem Alkohol, zuletzt mit Nelkenöl.

In einigen Fällen, besonders wenn die Kerne die Farbe zu leicht abgeben, fährt man besser bei der Methode von GRAM (*Fortschr. Med. 2. Bd. 1884 No. 6), indem man nämlich die gefärbten Schnitte mit einer Lösung von 1 g Jod und 2 g Jodkalium in 300 ccm Wasser behandelt, bis sie ganz schwarz geworden sind, sie dann in neutralen Alkohol bringt, wo sie grau werden, und zuletzt in Nelkenöl differenzirt. So wird das Chromatin nur in den Mitosen kräftig gefärbt.

Das ausserordentlich starke Gentianaviolett wirkt genau so scharf wie das Safranin und ist ihm vielleicht noch für manche Untersuchungen an sehr dünnen Schnitten vorzuziehen (dicke werden wegen der vielen Kerne leicht zu dunkel). Auch eignet es sich gut zu Doppelfärbungen mit rothen oder gelben Plasmafarbstoffen.

Die Farbe hält sich recht gut in Dammar, allerdings nicht so gut wie das Safranin.

Das Gentianaviolett färbt in essigsaurer Lösung die Kerne in frischen Geweben (Flemming, l. c.) und ist auch mit indifferenten Medien zuweilen zum Färben intra vitam (§ 206) recht nützlich.

Ueber eine Doppelfärbung mit Safranin und Gentianaviolett s. HERMANN (Arch. Mikr. Anat. 34. Bd. 1889 p. 60).

Das Gentianaviolett ist wohl zuerst von WEIGERT (Arch. Path. Anat. 84. Bd. 1881 p. 279) benutzt worden. Wie bereits MAYER (Sitzungsb. Akad. Wien 85. Bd. 1882 3. Abth. p. 70) angibt, besteht es im Wesentlichen aus Methylviolett B. Von Grübler & Hollborn erfahre ich (Mayer), dass die Berliner Aktiengesellschaft für Anilinfabrikation, von der es auch Weigert bezog, davon 3 Sorten herstellt, die sich nur durch die relativen Mengen des Zusatzes von Kristallviolett (Hexamethylpararosanilinchlorhydrat) zum Methylviolett (der Penta-Verbindung) unterscheiden.

287. Dahlia (Monophenylrosanilin), von ZUPPINGER (Arch. Mikr. Anat. 10. Bd. 1874 p. 256) zuerst erwähnt, wurde von EHRLICH (ibid. 13. Bd. 1876 p. 266) zum Färben der Kerne auf Schnitten empfohlen. Ehrlich benutzte dafür eine neutrale wässerige Lösung und zog mit ganz schwacher Essigsäure aus. — Nach FLEMMING (ibid. 19. Bd. 1881 p. 324), der zur Differenzirung Alkohol benutzt, färbt es die Kerne ebenso scharf und stark wie Gentianaviolett und Safranin.

Ueber die Färbung der Mastzellen nach Ehrlich s. unten § 773.

288. Methylviolett (Methylanilin, Anilinviolett, Pariser Violett). GRASER (*D. Zeit. Chir. 27. Bd. 1888 p. 538; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 378) färbt die Schnitte von Material aus Chromosmiumessigsäure 12 bis

24 Stunden lang mit einer wässerigen Lösung, die so schwach ist, dass am Ende dieser Zeit die Schnitte die ganze Farbe an sich gerissen haben. Dann wäscht er sie kurze Zeit mit angesäuertem, darauf mit reinem absolutem Alkohol (und bringt sie wohl in Balsam). — SCHIEFFERDECKER sagt in seinem Referate, die Kerne färbten sich sogar noch besser als mit Safranin.

Ueber die Anwendung von Methylviolett auf frische Gewebe s. unten § 340, auf Mastzellen § 773.

289. Toluidinblau. Es steht dem Thionin und Methylenblau chemisch nahe und färbt auch ähnlich, aber nach MAYER (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 315) lassen sich die Färbungen leichter unversehrt in Balsam bringen und halten sich darin länger als die mit Thionin. Zuerst (1890) hat es Hoyer (s. unten § 800) zur Färbung des Schleims angewandt.

MANN (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 489) benutzt es mit gutem Erfolge nach Eosin, das dabei zur Färbung des Plasmas dient.

HARRIS (Philadelphia Med. Journ. 1898; Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd. 1899 p. 60) gelangt zu ähnlichen Resultaten wie Mayer und zieht ebenfalls das Toluidinblau (in wässeriger Lösung, noch besser zu lösen in „Karbolsäure-Wasser") dem Thionin vor. Zur intravitalen Färbung der Gewebe, besonders des Nervensystems sei es dem Methylenblau wenigstens gleich zu stellen. (Färbung, Fixirung etc. genau wie bei diesem; s. in Kapitel 15.) Ueber Plasmafärbung s. p. 190 (MATHEWS).

290. Ueber **Methylenblau** in allen seinen Anwendungen s. Kapitel 15, über **Cyanin** (Chinolinblau) unten § 334.

291. Viktoriablau. LUSTGARTEN (*Med. Jahrb. Ges. Aerzte Wien 1886 p. 285) verwendet es in wässeriger Lösung zur Färbung der Kerne. Ich (LEE) finde, es färbt sehr gut, namentlich wenn die Schnitte vorher einige Minuten mit Jodtinktur behandelt worden sind. Es hat eine specielle Neigung zu den elastischen Fasern; um sie zu färben, nimmt Lustgarten eine alkoholische Lösung, die mit dem 2—4fachen an Wasser verdünnt ist. Ich glaube aber, die Gewebe müssen vorher in einem Chromosmium- oder wenigstens in einem Chromgemisch fixirt sein und lange gefärbt werden. Auch den Schleim färbt das Blau stark, und Alkohol zieht diese Farbe nicht aus.

292. Benzoazurin ist von ZSCHOKKE (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 468) und von MARTIN (ibid. 6. Bd. 1889 p. 193) empfohlen werden. Man färbt die Celloidinschnitte etwa 1 Stunde lang in schwacher wässeriger Lösung, wäscht mit Salzsäure-Alkohol aus und erhält dann nur die Kerne, durch Auswaschen mit neutralem Alkohol hingegen auch das Plasma gefärbt.

293. Magdalaroth (Naphthalinroth). Nach FLEMMING (Arch. Mikr. Anat. 19. Bd. 1881 p. 324) färbt es ähnlich dem Safranin oder Dahlia. Es scheint jedoch nicht recht in Aufnahme gekommen zu sein.

294. Fuchsin (salzsaures, essigsaures etc. Rosanilin oder Pararosanilin etc., im Handel bekannt als Rubin, Fuchsin, Anilinroth, Roseïn, Magenta, Solferino, Neufuchsin, Parafuchsin etc.). Nach FLEMMING (l. c. p. 324) färbt es genau wie Safranin, aber etwas blauer. Neuerdings wird es zum Färben der Kerne nur noch wenig angewandt. Man benutzt, da sich das gewöhnliche Fuchsin in Wasser schlecht löst, entweder eine starke Lösung in etwa 50%igem Alkohol oder eine ganz schwache wässerige (Neu- und Parafuchsin sind leichter löslich) und differenzirt in starkem Alkohol. Auch das Karbolfuchsin nach ZIEHL ist brauchbar (s. Schenck in: Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 39). Man löst 1 g Fuchsin in 100 ccm Wasser, 10 ccm Alkohol und 5 ccm Karbolsäure (oder gibt zu einer 5%igen wässerigen Lösung von Karbolsäure soviel von einer konzentrirten alkoholischen Lösung von Fuchsin, bis sich an der Oberfläche eine Haut mit Metallglanz ausscheidet).

Die Methode von JACKSON (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 14 1874 p. 139), aus dem Fuchsin die Farbbase durch Gerbsäure zu fällen und mit dem in Alkohol und Essigsäure gelösten Tannate zu färben, ist nach meinen (MAYER) Erfahrungen unbrauchbar.

GRASER (*D. Zeit. Chir. 27. Bd. 1888 p. 538; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 378) verfährt entweder wie bei seiner Methode mit Methylviolett (§ 288) oder färbt 12—24 Stunden mit einer schwachen wässerigen Lösung, wäscht kurz mit Alkohol, färbt einige Minuten mit einer wässerigen Lösung von Methylenblau und entwässert. Chromatin und Kernkörperchen roth, der Rest blau.

RÖTHIG (Arch. Mikr. Anat. 56. Bd. 1900 p. 354) empfiehlt Kresofuchsin. Dieses färbt in wässeriger Lösung Kerne, Schleim, Knorpel und Horn roth, die elastischen Fasern gar nicht; in alkoholischer dagegen letztere blau, Schleim, Knorpel und Horn roth. (S. auch § 777 die Methode von Weigert, sowie § 881.)

Ueber die Färbung der Plasmazellen s. § 773, über eine Doppelfärbung mit Fuchsin und Jodgrün oder Methylgrün s. § 642.

Das salpetersaure Rosanilin wurde bereits 1863 von ROBERTS (Proc. R. Soc. London Vol. 12 p. 481) benutzt, desgleichen ein Anilinroth von WALDEYER.

295. Neutralroth. Zur Kernfärbung hat es DAUEN (Morph. Arb. Schwalbe 7. Bd. 1897 p. 369) benutzt; die Wirkung sei der des Safranins „recht ähnlich“. — S. auch unten § 692 (ROSIN).

Ueber **Congoroth** unten s. § 321.

296. Malachitgrün (Solidgrün, Viktoriagrün, Neugrün, Benzoylgrün, Echtgrün). FLEMMING (Arch. Mikr. Anat. 19. Bd. 1881 p. 324) rühmt dem Solidgrün eine spezielle Affinität zu den Nucleolen nach, im Uebrigen seien die Färbungen blasser als die mit Safranin oder Magdalaroth. — VAN BENEDEN & NEYT (Bull. Acad. Belg. (3) Tome 14 1887 p. 214) benutzen das Malachitgrün zum Färben der Eier von *Ascaris* (mit Einschluss in Glycerin). Ich (LEE) habe die Präparate vergeblich in Balsam zu bringen versucht: die Farbe widersteht dem Alkohol nicht. — S. auch oben p. 191 (HERLA).

297. Mit **Nigrosin** nach ERRERA (*Proc. Verb. Soc. Belge Micr. 1881 p. 134) habe ich (LEE) gute starke Kernfärbungen erhalten. Dem Alkohol widersteht es gut.

15. Kapitel.

Färben mit Methylenblau.

298. Methylenblau ist das Chlorhydrat oder das Zinkchlorid-Doppelsalz des Tetramethylthionins und in Ehrlichs Sinne ein basischer Farbstoff. Man scheint es hie und da mit Methylblau verwechselt zu haben, das aber gar nichts mit ihm zu thun hat. Das Methylenblau des Handels enthält zuweilen eine geringe Menge eines rothen Farbstoffes. Das ist aber durchaus nicht unerwünscht, im Gegentheil, dieses „Roth aus Methylenblau“ liefert mitunter Differenzirungen in Zellen oder Geweben, die sich sonst nicht erzielen lassen. Es bildet sich in alten Lösungen des Blaues, besonders bei Gegenwart von Alkali, und ist auch in Unnas polychromem Methylenblau (bei Grübler & Hollborn zu haben) vorhanden, das zum Färben von Zellkörnelungen dient. S. hierüber Genaueres in § 774 und über die Farbstoffe, die bei der Doppelfärbung mit Methylenblau und Eosin in Frage kommen mögen, § 326.

Dagegen muss das Blau zum Färben der Nerven intra vitam so rein wie möglich sein. Nach Apáthy (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 466) eignet sich hierzu am besten — jedenfalls wenn man genau seine Resultate (§ 304) erzielen will, nur dieses — das von E. Merck in Darmstadt; es steht in dessen Preisliste als medizinisches Methylenblau und auf der Etikette als: Anilinblau, Methylen, chemisch rein und chlorzinkfrei. Bestellt man sich also Methylenblau, so sollte man genau angeben, wozu man es benutzen will.

299. Anwendung des Methylenblaus. Zum Färben der Kerne kann es in derselben Weise dienen wie z. B. das Thionin (§ 284), mit dem es ja nahe verwandt ist. Ferner braucht man es zur spezifischen Tinktion markhaltiger Nervenfasern auf Schnitten und der Mast- und Plasmazellen. Auch färbt es allerlei lebende Gewebe ganz oder beinahe ohne Beeinträchtigung ihrer vitalen Funktionen (§ 300). Endlich aber liefert es Färbungen des Nervensystems, der intercellulären Kittsubstanzen, Lymph-

bahnen etc., im Wesentlichen denen gleich, die eine gut gelungene Imprägnation mit Gold oder Silber aufweist, aber viel leichter und sicherer zu erzielen. Und während das Gold viele nervöse Elemente zugleich, mitunter alle imprägnirt, färbt das Methylenblau nur verhältnissmässig wenige, diese aber dafür um so schärfer, sodass sie sich auf weite Strecken verfolgen lassen, ähnlich wie nach Golgis Methode mit Chromsäure und Silber.

Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 314) färbt mit einem Gemisch von relativ viel Methylviolett und wenig Methylenblau in wässeriger Lösung, dem etwas Essigsäure zugesetzt worden ist, und erhält so die Kerne schön blau, den Schleim violett.

Ueber Plasmafärbung durch Methylenblau s. auch p. 190 (Mathews).

300. Färbung ganzer Thiere intra vitam. Kleine, gut durchlässige Wasserthiere kann man lebendig färben, indem man zum Wasser soviel Methylenblau setzt, dass es nur ganz schwach blau wird. Sind die Thiere durchsichtig, so lassen sie sich ohne Weiteres jederzeit unter dem Mikroskop beobachten, und es zeigt sich dann, dass nach einiger Zeit manche Gewebe den Farbstoff aufgenommen haben, andere nicht. Setzt man die Thiere wieder in das Wasser zurück und wartet lange genug, so findet man auch andere Gewebe gefärbt. Man könnte nun glauben, bei längerer Dauer der Selbstfärbung würden zuletzt alle Gewebe gefärbt werden. Dem ist jedoch nicht so: stets bleiben sie auf dem Maximum der Tinktion nur kurze Zeit stehen und geben dann den Farbstoff noch rascher ab, als sie ihn aufgenommen haben; und so ereignet es sich sehr oft, dass die sich zuerst färbenden Elemente ihre Farbe schon beinahe oder ganz wieder eingebüsst haben, wenn die späteren gerade das Maximum erreichen. Ja, es können sogar alle färbbaren Gewebe die ganze Tonleiter der Färbung und Entfärbung durchmachen, bis das Thier wieder genau so farblos ist, wie zu Anfang, und all dies ohne anscheinende Veränderung in seiner Lebensthätigkeit. Daher ist diese vorübergehende Färbung nicht echt (s. § 206).

In dieser Weise lässt sich also die Totalfärbung eines Thieres kaum erreichen, wohl aber eine spezifische Färbung einer oder der anderen Gruppe von Geweben, und zwar auf zwei Wegen: 1) färbt sich das gewünschte Gewebe früher als die anderen, so kann man es studiren, wenn es allein intensiv genug tingirt ist, während die übrigen noch nicht so weit sind; färbt es sich dagegen später, so wartet man, bis die übrigen sich schon wieder genügend entfärbt haben; 2) man fixirt die Farbe in einem dieser Stadien und macht sich Dauerpräparate (§ 305), um sie in Ruhe zu studiren. (Siehe auch die Notizen von Pilliet in: C. R. Soc. Biol. Paris (10) Tome 4 1897 p. 886.)

Die richtige Stärke der jedenfalls sehr schwachen Lösungen muss man für jedes Objekt erst ausprobiren. In der Praxis wird wohl der Farbenton den richtigen Führer bilden, ist man aber im Zweifel, so nehme man 1:100000 und verstärke oder schwäche je nach Bedürfniss. Nach Zoja (Rend. Istit. Lombardo

Milano Vol. 25 1892; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 208) eignet sich für *Hydra* 1:20000 bis 1:10000.

Die Färbung ist etwas launenhaft. Ohne Probe lässt sich nicht sagen, welche Gewebe sich zuerst färben werden. Uebrigens dringt der Farbstoff sehr schlecht ein, und dies erklärt vielleicht hauptsächlich die anscheinende Launenhaftigkeit und bestimmt zugleich wesentlich die Reihenfolge, worin die Gewebe sich färben. In der Regel färben sich die Drüsenzellen früh, dann ohne bestimmbare Ordnung andere Epithelzellen, Fettzellen, Plasmazellen, Mastzellen, Blut- und Lymphzellen, elastische Fasern, glatte Muskeln, quergestreifte Muskeln. Auch gibt es Elemente, die sich zwar intravital färben, aber nicht, wenn man, wie oben angegeben, die ganzen Thiere unversehrt in die schwache Lösung bringt. Dies sind in erster Linie die Nervenfasern und Ganglienzellen: sie färben sich dann garnicht, höchst wahrscheinlich einfach deshalb, weil die Farbe nicht bis zu ihnen hindringt. — S. auch oben p. 142 (Overton).

301. Färben des Nervengewebes intra vitam. Ehrlich (Biol. Centralbl. 6. Bd. 1886 p. 215) erhielt durch Injiziren einer Lösung von Methylenblau in die Gefässe oder Gewebe lebender Thiere die Axencylinder der Nervenfasern spezifisch gefärbt. Er glaubte, und mit ihm die meisten Forscher, diese Färbung sei das Produkt einer vitalen Reaktion der Gewebe und könne an todtem Material nicht erzielt werden. Von dem Standpunkte jedoch, der oben in § 206 eingenommen wird, scheint das Gegentheil richtig zu sein. Natürlich ist die Färbung insofern eine Erscheinung intra vitam, als sie im lebenden Organismus vor sich geht, aber die Gewebe selber nehmen die Farbe erst dann an, wenn sie todt oder wenigstens am Absterben sind.

Wie gesagt, glaubte man früher, an todtem Material lasse sich die Reaktion nicht erzielen. Indessen sah Dogiel (Arch. Mikr. Anat. 35. Bd. 1890 p. 310) die Nerven in den Beinmuskeln des Frosches sich noch 3—8 Tage, nachdem die Beine abgeschnitten worden waren, färben. Er meint nun, die Reaktion beweise, dass die Nerven dann noch lebendig gewesen seien. Jedoch wird man richtiger mit Apáthy (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 15 ff.) daraus folgern, dass sich die Nerven auch nach dem Aufhören des Lebens noch färben. Nach Apáthys Versuchen hierüber braucht das Gewebe nicht mehr zu leben, muss aber noch frisch sein; nichts darf daraus auf chemischem Wege extrahirt, und auch durch physikalische Mittel darf sein Zustand nicht wesentlich verändert sein; z. B. es darf nicht einmal mit verdünntem Glycerin oder Alkohol behandelt worden sein, während kurze Behandlung mit Normalsalzwasser nicht sehr schadet; auch darf es nicht vorher durch Hitze koagulirt werden.

Holmgren (Anat. Anzeiger 14. Bd. 1898 p. 417) bringt marine Krebse *(Palaemon)* erst auf etwa 1/2 Stunde lang in Normalsalzwasser, um die Seesalze auszuwässern, und injizirt erst dann das ebenfalls in Normalsalzwasser gelöste Methylenblau. Er will auf diese Weise viel bessere Bilder erhalten haben.

Allgemein wird ferner geglaubt, zur Reaktion der Nerven auf Methylenblau sei die Gegenwart von Sauerstoff nöthig. Man legt daher auch gewöhnlich das gewünschte Organ nach der Injektion oder Durchtränkung mit Methylenblau frei und lässt es einige Zeit an der Luft liegen. Apáthy (l. c. p. 25) zeigt jedoch, dass diese Praxis zwar in einzelnen Fällen richtig, die Annahme jedoch irrig ist. Er geht davon aus, dass es sich hier um eine regressive Färbung handle. Wenn nämlich ein Gewebe das Maximum der Färbung erreicht hat, so gibt es bald nachher die Farbe wieder an die umgebende Flüssigkeit ab (s. oben p. 199). Je grösser nun die Menge von dieser ist, desto rascher wird sich die Farbe auswaschen; daher muss man möglichst wenig Flüssigkeit verwenden. Ferner nehmen die Präparate beim Liegen an der Luft aus dieser eine Spur Ammoniak auf, und Apáthy hat experimentell festgestellt, dass dies ein wichtiger Faktor für eine scharfe Färbung ist.

Bereits Ehrlich, dem wir die Methode der intravitalen Färbung mit Methylenblau verdanken, ist der Ansicht (Biol. Centralbl. 6. Bd. 1886 p. 223), man komme mit der Hypothese vom engen Konnex der „Nervenbläuung und Sauerstoffsättigung“ nicht völlig aus, sondern es sei zum Eintritt der Färbung auch eine alkalische Reaktion des Gewebes nöthig.

302. Färbung der Nerven durch Injektion oder Immersion. In Anlehnung an Ehrlich hat man früher die Lösung von Methylenblau in die Leibeshöhle oder das Gefässsystem des lebenden Thieres injizirt, eine Zeit lang auf das gewünschte Organ wirken lassen und dieses dann zu weiterer Präparation und zum Studium freigelegt. Einige Forscher scheinen geglaubt zu haben, es sei nothwendig oder wenigstens gut, den Farbstoff in das ganze Thier zu injiziren. Indessen weiss man jetzt, dass das ziemlich gleichgültig ist, und dass die Reaktion ebenso gut eintritt, wenn man das Organ erst herausschneidet und dann wie gewöhnlich in die Färbflüssigkeit legt. Mithin mag man im Allgemeinen die Bequemlichkeit darüber entscheiden lassen, ob man die Injektion oder die Immersion anwendet. Aber es scheint doch fast, als wenn in einzelnen Fällen die Injektion, wenn auch nicht geradezu nothwendig, so doch besser sei.

303. Die Färblösungen. Zur Injektion macht man sie gewöhnlich in Salzwasser (dem normalen oder einem etwas schwächeren), zur Immersion entweder auch so oder in einer anderen „indifferenten" Flüssigkeit oder in reinem Wasser. Früher nahm man gewöhnlich sehr starke Lösungen.

So injizirt Arnstein (Anat. Anzeiger 2. Jahrg. 1887 p. 125) 1 ccm einer konzentrirten Lösung in die Vena cutanea magna eines Frosches und schneidet das gewünschte Organ 1 Stunde später heraus; Biedermann (Sitzungsb. Akad. Wien 96. Bd. 1887 3. Abth. p. 23) injizirt 1/2—1 ccm einer nahezu gesättigten Lösung in 0,6%igem Salzwasser in den Thorax von Flusskrebsen und tödtet sie nach 2—4 Stunden; Mayer (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 423) verwendet Lösungen von 1 : 300—1 : 400 in 1/2%igem Salzwasser. (Injiziren kann man entweder mit einer Spritze oder einem anderen Apparat oder durch Autoinjektion vom Herzen aus. Sogar Kaninchen vertragen dies, wenn die Athmung künstlich unterhalten wird.) Retzius verwendet ebenso starke Lösungen. — Für Nemertinen nimmt Bürger (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1891 p. 206; Fauna Flora Golf. Neapel 22. Monogr. 1895 p. 443) eine 1/2%ige Lösung in Wasser oder 1/2%igem Salzwasser; er injizirt sie und lässt dann die Thiere 6—12 Stunden, auch noch länger, in feuchtem Fliesspapier liegen. — Duboscq (Arch. Z. Expér. (3) Tome 6 1899 p. 483) braucht für Chilopoden eine konzentrirte Lösung. — S. auch unten § 735.

Gegenwärtig neigt man wenigstens für die Wirbellosen mehr zu schwächeren Lösungen: Apáthy (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 26) hält es nicht nur für überflüssig, sondern sogar geradezu für schädlich, sie stärker als 1 : 1000 zu wählen.

Zur Immersion mag man ähnliche Lösungen verwenden wie zur Injektion, aber sie sollten eher noch schwächer sein.

So bringt Dogiel (Arch. Mikr. Anat. 35. Bd. 1890 p. 308) die Objekte in einige Tropfen von Humor aqueus, gibt 2 oder 3 Tropfen einer 1/16—1/15%igen Lösung von Methylenblau in Normalsalzwasser hinzu und setzt sie hierin der Luft aus; in dünnen Geweben zeigt sich die Färbung bereits nach 5—10 Minuten und erreicht das Maximum in 15—20 Minuten; für dickere Objekte, z. B. die Retina, können mehrere Stunden erforderlich werden, und dabei muss man das Präparat durch abwechselnden Zusatz von 1 oder 2 Tropfen des Humor aqueus und der Färblösung gerade feucht halten. Die Reaktion wird durch Einlegen des Präparates in einen Brütofen bei 30—35° C. beschleunigt. — Rouget (Compt. Rend. Tome 117 1893 p. 802) modifizirt für Froschmuskeln die Methode von Dogiel dahin, dass er eine 1/20%ige Lösung in 0,6%igem Salzwasser anwendet. — Allen (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 36 1894 p. 462 u. 484) bedient sich bei den Embryonen von *Homarus* einer Lösung von 1/10% in Normalsalzwasser und verdünnt sie mit dem 15—20fachen Volumen an Seewasser.

Lavdowsky (Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 177) legt die Gewebe in eine 1/10—1/4%ige Lösung des Blaus in Hühnereiweiss (auch Blutserum, sowie Lösungen von Chlorammonium und Ferrum ammoniochloratum eignen

sich als Menstruum) und erhält damit unvergleichlich viel mehr nervöse Elemente gefärbt als mit den gewöhnlichen Lösungen. — Aehnlich verfährt Young (Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1898 p. 253) mit Scheiben, die er von frischen menschlichen Geweben mit dem Doppelmesser abgetrennt hat.

304. Apáthys Methode für Wirbellose (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 15; Mikrotechnik p. 172). Ein Stück des Bauchstranges einer Hirudinee wird freigelegt oder auch herauspräparirt, aber den Blutsinus und das pigmentirte Bindegewebe lässt man besser noch darum, bis Färbung und Fixirung beendet sind. Will man jedoch ausser den Fasern auch möglichst viele Ganglienzellen gefärbt haben, so schneidet man Seitennerven und Konnektive nahe beim Ganglion durch. Dann wird das Präparat in die Flüssigkeit zum Färben gelegt; diese besteht, wenn es sich hauptsächlich um die Fasern bei *Hirudo* und *Pontobdella* handelt, aus einer Lösung (in $^1/_2$—$^3/_4$ %igem Salzwasser) von 1 : 1000 (man lässt sie 10 Minuten lang wirken) oder von 1 : 10000 (1—$1^1/_2$ Stunden) oder von 1 : 100000 (3 Stunden); *Lumbricus* erfordert überall die doppelte Zeit, *Astacus* und *Unio* die dreifache (markhaltige Nerven von Wirbelthieren die vierfache). Zur Demonstration von Ganglienzellen lässt man den Farbstoff 3—4 mal so lange wirken.

Ist die Färbung beendet, so wäscht man die Präparate, die in der Lösung von 1 : 1000 waren, in Salzwasser 1 Stunde lang, die von 1 : 10000 nur $^1/_4$ Stunde, und die von 1 : 100000 gar nicht; dann giesst man eins von den ammoniakalischen Fixir- und Differenzirgemischen (§ 305) über sie und lässt sie, ohne sie darin herum zu bewegen, wenigstens 1 Stunde lang so liegen, womöglich im Dunkeln. Die Weiterbehandlung s. im § 305.

Das Ammoniak in diesen Gemischen dient zur Differenzirung der Färbung. Es wäscht nämlich die Farbe aus gewissen Elementen heraus, aus anderen hingegen nicht so leicht, wirkt also gerade wie die Salzsäure beim Boraxkarmin. Ausgewaschen werden hier die protoplasmatischen Theile der Nervenfasern, ihre interfibrilläre und perifibrilläre Substanz, während die Primitivfibrillen die Farbe noch stark zurückhalten.

Von theoretischem Interesse ist es, dass nach Apáthy hierdurch eine echte Färbung dieser Primitivfibrillen zu Stande kommt, keine Imprägnation: die Fibrillen sind scharf violettblau gefärbt ohne körniges Präzipitat, während die Inter- und Perifibrillärsubstanz nebst den Kernen entweder gar nicht oder nur sehr hell gefärbt ist. Dagegen bleiben mit den gewöhnlichen Methoden die Primitivfibrillen farblos, während Interfibrillärsubstanz und Protoplasma der Nervenfasern mit einem feinkörnigen grünschwarzen oder violetten Präzipitat imprägnirt und die Kerne wie gewöhnlich gefärbt sind.

305. Konserviren der Präparate. Haltbare Präparate gewinnen ist gar nicht leicht, denn die Farbe hält sich so wenig, dass sie, wie oben erwähnt, sogar im lebenden, noch nicht völlig imprägnirten Gewebe nach kurzer Zeit wieder abblasst. Indessen lässt sie sich doch einigermaassen fixiren.

Dogiel (Arch. Mikr. Anat. 33. Bd. 1889 p. 442) bringt wie Arnstein (Anat. Anzeiger 2. Jahrg. 1887 p. 551) die Präparate in eine gesättigte wässerige Lösung von Ammoniumpikrat auf 1/2 Stunde oder länger, wäscht sie darauf mit frischer Lösung und studirt sie entweder in verdünntem Glycerin oder hebt sie für immer in Glycerin, das mit Ammoniumpikrat gesättigt ist, auf. Neuerdings (Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 15) empfiehlt er, sie im Pikrat 18—24 Stunden zu lassen und dann direkt in ganz reines säurefreies Glycerin einzuschliessen. Allerdings macerirt das Ammoniumpikrat manche Gewebe sehr, aber man kann dem durch Zusatz von 1—2% einer 1%igen Osmiumsäurelösung abhelfen. Und will man die Gewebe zum Schneiden härten, so muss man die Osmiumsäure darin vervierfachen.

Mayer (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 422) verwendet ein Gemisch gleicher Theile von Glycerin und gesättigter Lösung von Ammoniumpikrat zum Fixiren der Färbung und Einschliessen der Präparate. Im Prinzip gleich ist die Methode von Retzius (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 7. Bd. 1890 p. 328). Indessen hält Dogiel nach sorgfältigem Studium dies durchaus nicht für eine Verbesserung.

Andere Forscher nehmen eine gesättigte Lösung von Jod in Jodkalium (so Arnstein) oder Pikrokarmin (so Feist in: Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. 1890 p. 116), und letzteres gewährt noch den Vortheil, das Blau der Färbung als solches zu erhalten, falls man es nicht zu lange einwirken lässt und das Präparat in reines Glycerin einschliesst. Lavdowsky hat reine Pikrinsäure empfohlen, aber auch diese wird nach sorgfältiger Prüfung von Dogiel verworfen.

Nach Apáthy (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 30) ist freies Ammoniak ein Hauptfaktor beim Differenziren der Färbung (s. oben p. 203). Er bringt die Präparate — nach dem Auswaschen in Salzwasser, wenn sie in starker Lösung gefärbt waren, sonst aber direkt — entweder in eine konzentrirte wässerige Lösung von Ammoniumpikrat, die keine freie Pikrinsäure, dagegen auf jede 100 ccm 5 Tropfen starken Ammoniaks enthält, oder, was im Allgemeinen besser ist, in eine 1—2%ige frische Lösung von Ammoniumkarbonat, die mit Ammoniumpikrat gesättigt ist. Darin bleiben sie, am besten im Dunkeln, wenigstens 1 Stunde und kommen dann in eine geringe Menge von 50%igem Glycerin, das mit Ammoniumpikrat gesättigt ist, so lange, bis sie ordentlich damit durchtränkt sind. Von da gelangen sie in ein ebenfalls mit dem Pikrat gesättigtes Gemisch von

2 Theilen 50 %igem Glycerin, 1 Theil kalt gesättigter Zuckerlösung und 1 Theil kalt gesättigter Gummilösung. Sind sie damit gut durchtränkt, so werden sie endlich in einen Syrup eingeschlossen, der so bereitet wird (l. c. p. 37): ausgesuchtes Gummi arabicum, Rohrzucker und destillirtes Wasser je 50 g werden auf dem Wasserbade gelöst und mit 0,05 g Thymol versetzt. Dies Medium wird rasch so hart wie Balsam, man braucht also die Deckgläser nicht zu umrahmen. Auch das Gemisch von Farrants (aber ohne die arsenige Säure) ist gut, indessen keinem von beiden darf man Ammoniumpikrat oder Methylenblau zusetzen.

Die Präparate nach dieser Methode sind äusserst empfindlich gegen das Licht, besonders gegen Lampenlicht, wenn es bei der Beobachtung durch den Kondensor geht, und dies liegt zum Theil an den gelben Strahlen, zum Theil an der Wärme.

Apáthy (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1897 p. 712) gibt neuerdings an, im Gummisyrup seien die Präparate seit 5—6 Jahren ganz unverändert; jedoch gelte dies nicht von denen, wo er die Differenzirung mit Ammoniak bis zur optischen Isolirung der Neurofibrillen getrieben habe, denn diese seien längst verblasst. — S. auch die Bemerkungen von Bethe (Arch. Mikr. Anat. 51. Bd. 1898 p. 387).

306. Methoden für Schnitte. Keine der obigen Methoden reicht völlig aus, da man nach ihnen die Präparate nicht unbeschädigt in Paraffin bringen kann. Die Farbe bleibt in der Regel nicht schön blau, sondern wird zu einem Grau, dessen Ton von rothbraun zu blau oder grünlich schwarz variirt. Selten halten sie sich länger als einige Monate, auch können sie nicht in Balsam eingeschlossen werden. Eine starke Lösung von Platinchlorid soll zwar nach Feist (l. c.) das Einbetten in Celloidin oder Paraffin erlauben, jedoch gibt sie einen flockigen Niederschlag, und die Präparate stellen nicht sonderlich zufrieden.

Parker (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1895 p. 4) fixirt die Färbung durch Sublimatlösung, entwässert dann die Präparate mit 8 %igen Lösungen von Sublimat in Alkohol von 30, 50, 70, 95 und 100 % und bringt sie aus der letzten in ein Gemisch von gleichen Theilen dieses 100 %igen Sublimat-Alkohols und Xylol, endlich in reines Xylol; hierin können sie beliebig lange bleiben.

Früher (Z. Anzeiger 15. Jahrg. 1892 p. 375) benutzte Parker zum Entwässern eine Lösung von Sublimat in Methylal, aus der die Objekte dann allmählich in reines Xylol und von hier in Paraffin gelangten.

Bethe (Anat. Anzeiger 12. Bd. 1896 p. 438) behandelt nach dem Färben die Stücke (von 2—3 mm Dicke) etwa 10—15 Minuten lang

mit einer konzentrirten wässerigen Lösung von Ammoniumpikrat und bringt sie dann direkt in eine Lösung von Ammoniummolybdänat (1 g) in Wasser (20 g; oder 10 g und ebenso viel $^1/_2$ %ige Osmiumsäure oder 2 %ige Chromsäure) oder von Natriumphosphormolybdänat (Proportion genau so); alle diese 6 Lösungen erhalten als Zusatz 1 Tropfen Salzsäure und nach Belieben auch 1 g Wasserstoffhyperoxyd. (Gegen Alkohol sind die Objekte, wenn sie in einer von den 3 Lösungen des Natriumsalzes gewesen sind, nicht so widerstandsfähig, daher ist hier eine Temperatur unter 15 ° C. vortheilhaft; aber sie scheinen sich besser in Balsam zu halten.) In einer von den Lösungen bleiben die Stücke etwa $^3/_4$—1 Stunde (bei Gegenwart von Osmiumsäure 4—12 Stunden), kommen dann in Wasser, Alkohol, Xylol, Balsam oder Paraffin; die Schnitte werden mit Alaunkarmin, Alaunkochenille oder neutralen Theerfarbstoffen nachgefärbt.

Nach einer älteren Methode löst Bethe (Arch. Mikr. Anat. 44. Bd. 1894 p. 585) Ammoniummolybdänat (1 g) in destillirtem Wasser (10 ccm), gibt Wasserstoffhyperoxyd (1 g) hinzu, wodurch die Mischung gelb wird, und dann 1 Tropfen Salzsäure (der weisse Niederschlag von Molybdänsäure löst sich beim Umschütteln wieder). In dieses Gemisch, das höchstens 8 Tage alt und am besten auf etwa 0 Grad abgekühlt sein sollte, kommen die gefärbten und mit Salzwasser abgespülten Objekte auf 2—3 Stunden, wenn sie klein sind, auf 4—5, wenn sie etwa 1 ccm gross sind. Dann werden sie $^1/_2$—2 Stunden lang mit Wasser gewaschen, in Alkohol (womöglich ebenfalls bei etwa 0 °) entwässert und wie gewöhnlich in Celloidin oder durch Xylol in Paraffin eingebettet.

Obige Vorschrift gilt für Vertebraten; für Invertebraten nimmt man 1 g Ammoniummolybdänat, 10 ccm Wasser und $^1/_2$ ccm Wasserstoffhyperoxyd.

Leichte Abänderungen der späteren Methode von Bethe gibt Dogiel (Arch. Mikr. Anat. 49. Bd. 1897 p. 772 und: Zeit. Wiss. Z. 66. Bd. 1899 p. 361, 364) an: er lässt Salzsäure und Wasserstoffhyperoxyd fort, kühlt auch die Objekte nicht ab. Indessen ist Bethe (Zeit. Wiss. Mikr. 17. Bd. 1900 p. 21) damit nicht einverstanden.

Pleschko (Anat. Anzeiger 13. Bd. 1897 p. 16) legt die Objekte nach der Fixirung des Methylenblaus mit Ammoniumpikrat auf einige Tage in 10 %iges Formol und macerirt oder schneidet sie dann.

Harris (Philadelphia Med. Journ. 1898; Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd. 1899 p. 62) legt die gefärbten Stücke nach dem Abspülen mit Wasser auf 3 bis 24 Stunden in eine kalte (nur wenige Grade über Null) gesättigte Lösung von gelbem oder rothem Blutlaugensalz, der er eine Spur Osmiumsäure zur Verhinderung der Maceration zugesetzt hat. Dann wäscht er sie mit Wasser aus und entwässert sie, ebenfalls bei niedriger Temperatur, durch absoluten Alkohol. Zuletzt durch Xylol oder Nelkenöl in Paraffin. — Diese Methode gilt auch für die Färbungen mit Toluidinblau.

307. Imprägnation von Epithelien, Lymphräumen etc. mit Methylenblau. DOGIEL (Arch. Mikr. Anat. 33. Bd. 1889 p. 442) legt geeignete Objekte, besonders dünne Membranen, frisch auf einige Minuten in eine 4%ige Lösung von Methylenblau in Normalsalzwasser, von da auf $^1/_2$ Stunde oder länger in eine gesättigte Lösung von Ammoniumpikrat, wäscht sie mit einem neuen Quantum derselben Lösung und untersucht sie in verdünntem Glycerin.

Will man nur die Zellgrenzen im Epithel demonstriren, so darf man im Allgemeinen nur 10 Minuten lang färben; will man hingegen die Grundsubstanz des Gewebes imprägniren, um ein negatives Bild der Saftkanäle oder anderer Hohlräume zu bekommen, so färbt man 15—20 Minuten, und es ist dann auch rathsam, das Endothel abzupräpariren, bevor man die Objekte in das Färbbad bringt. Um die Präparate aufzuheben, schliesst man sie am besten in Glycerin ein, das mit Ammoniumpikrat gesättigt ist. (Ueber eine Verbesserung der Methode s. oben p. 204.)

Der Effekt ist im Ganzen, abgesehen von der Farbe, gleich dem einer negativen Imprägnation mit Silber.

Zu gleicher Zeit wie Dogiel hat MAYER (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 422) ähnliche Experimente ausgeführt und dieselben Resultate erhalten. Er färbt die Gewebe etwa 10 Minuten lang in einer Lösung von Methylenblau (1 : 300 bis 400) in $^1/_2$%igem Salzwasser, wäscht sie mit Salzwasser aus und giesst das Gemisch von Glycerin und Ammoniumpikrat (oben p. 204) darauf. Nach seiner Erfahrung können alle wichtigen Resultate einer Imprägnation mit Silber auch durch Methylenblau erzielt werden. Die Bilder sind entweder positiv oder negativ; hat man das Methylenblau in das Gefässsystem injizirt, so sind die positiven häufiger, hat man aber das Objekt (die Cornea) in die Färblösung gelegt, so sind sie öfter negativ.

---

16. Kapitel.

Färben des Plasmas mit Theerfarbstoffen.

308. Plasmafarbstoffe. Unter Plasmafarbstoffen versteht man streng genommen nur solche Farbstoffe, die das Zellplasma färben, die Kerne hingegen nicht. Indessen darf man auch solche für die Intercellularsubstanzen hierher rechnen. Zu unterscheiden ist nun zwischen denen, die eine generelle, mehr diffuse Färbung ergeben, und denen, die sich speziell und mehr oder weniger elektiv auf die Einlagerungen im Plasma oder die Produkte des Plasmas, z. B. Schleim, Fett, Körnchen, elastische Fasern etc. werfen. Letztere sollen aber nicht hier, sondern in den betreffenden Kapiteln genau erörtert werden. Ebenso wird hier ganz abgesehen von den Methoden, das Plasma oder die Intercellularsubstanzen mit Karmin- oder Hämatoxylingemischen zu färben. (S. hierüber oben in Kapitel 11 und 12). Ueber das Kernschwarz s. unten § 346.

Die meisten Plasmafarbstoffe gehören zu den sogenannten sauren Theerfarbstoffen. Von ihnen sind manche ohne zureichenden Grund empfohlen worden, da sie nur eine allgemeine Färbung liefern, die sich durchaus nicht vor der guten mit Pikrinsäure oder Orange G auszeichnet. Ferner lassen sich durch geeignete Beizen wohl alle basischen Theerfarbstoffe zur Färbung des Plasmas etc. bewegen (s. z. B. oben p. 190 Methylgrün), allerdings ohne sonderlichen Vortheil.

In diesem Kapitel werden ferner behandelt die Methoden der Mehrfachfärbung, soweit sie nicht schon in den vorigen Kapiteln erledigt sind.

309. Pikrinsäure (Trinitrophenol). Schon FLEMMING (Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 360) hält sie wohl mit Recht für einen der nützlichsten Plasmafarbstoffe. Sie ist mit Vortheil nach den meisten Kernfarbstoffen, besonders nach Karmin- und Hämateïngemischen, anwendbar; jedoch muss man dabei einige Vorsicht üben, da man leicht damit überfärbt und dann die Kernfärbung schädigt. Dies gilt be-

sonders von den Hämateïngemischen, die ja gegen alle Säuren sehr empfindlich sind. Im Uebrigen hat man weiter nichts zu thun, als die Pikrinsäure in dem Alkohol zu lösen, den man zum Entwässern der mit dem Kernfarbstoff gefärbten Objekte nimmt; für Schnitte ist ebenso bequem eine Lösung in Xylol oder Chloroform.

Man vergesse ferner nicht, dass die Pikrinsäure andere Theerfarbstoffe beträchtlich auswäscht, und dass sie im Verein mit Salzsäure deren Fähigkeit, die Karminfärbung auszuziehen, beträchtlich zu erhöhen scheint. (Man löse sie daher auch nicht in dem sauren Alkohol, den man nach Boraxkarmin etc. braucht, sondern erst im neutralen Alkohol.) Endlich leistet sie, was nur sehr wenige Plasmafarbstoffe vermögen: sie färbt ganze Objekte leicht durch, und da sie äusserst rasch eindringt, so ist sie sehr brauchbar für die Präparation von kleinen Arthropoden, Nematoden etc., die unzerlegt eingeschlossen werden sollen.

Obwohl man mit der Pikrinsäure so ziemlich Alles in den Zellen färben kann, so werden doch speziell kräftig gelb Horn und Chitin, die Substanz der Muskeln, bestimmte Arten von Körnern in den Blutzellen etc. Dies tritt sowohl bei ihrer Anwendung nach Färbung der Kerne als auch zugleich mit ihr, d. h. in Gemischen wie den Pikrokarminen, zu Tage. In mancher Beziehung wird sie freilich vom Säurefuchsin oder Orange G übertroffen, hat aber vor diesen die unbegrenzte Haltbarkeit in Balsam voraus.

Historisches. Die Pikrinsäure wird zuerst nebenbei von Roberts (Proc. R. Soc. London Vol. 12 1863 p. 481) bei seinen Untersuchungen über das Blut erwähnt. Schwarz (Sitzungsb. Akad. Wien 55. Bd. 1. Abth. 1867 p. 674) hingegen wendet sie bereits seit 1865 nach Karmin und Gerlach 1872 (*Sitzungsb. Physik. Med. Soc. Erlangen) nach Alaunhämatoxylin an.

310. Orange G. Zu beziehen von Grübler & Hollborn und nicht mit den vielen anderen Farbstoffen zu verwechseln, die im Handel als Orange (mit oder ohne G) gehen. Es ist ein saurer Farbstoff im Sinne von Ehrlich und gehört zu den schärfsten Plasmafarbstoffen, färbt aber ziemlich blass und ist daher mit Nutzen nur zum Nachfärben nach Eisenhämatoxylin, Hämalaun oder einem anderen blauen oder rothen Kernfarbstoff zu verwenden. Man braucht es in konzentrirter wässeriger Lösung und lässt es nur auf Schnitte 5—10 Minuten lang einwirken. Ueberfärbung kommt dabei nicht vor, wohl aber können andere Theerfarbstoffe ausgewaschen werden. Hauptsächlich dient es übrigens in Verbindung mit Theerfarbstoffen, z. B. in Flemmings Orange (§ 311)

und in Ehrlichs Triacid (§ 316 u. 317). S. jedoch auch oben p. 181 § 268.

Die Lösungen halten sich nicht lange unverändert. — RAWITZ (Leitfaden 2. Aufl. p. 69) färbt die Schnitte 24 Stunden lang mit Orange und erst hinterher ganz kurz (1/2 Minute) mit seinem Hämalaun.

Nach FLEMMING (Arch. Mikr. Anat. 37. Bd. 1891 p. 685) soll es in wässeriger Lösung sauer reagiren. Indessen habe ich (MAYER) dies sowohl an dem Orange von Grübler als auch an dem der Berliner Aktiengesellschaft für Anilinfabrikation nicht gefunden, und LEE neuerdings ebensowenig. Wahrscheinlich hatte Flemming kein ganz reines Produkt vor sich.

311. **Orange G** nach FLEMMING (Arch. Mikr. Anat. 37. Bd. 1891 p. 296 u. 685; Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. 1897 p. 175). Man färbt die Schnitte von Material, das nach Flemming oder Hermann fixirt ist, 2—3 Tage oder sogar Wochen in starker alkoholischer Lösung von Safranin, die mit Anilinwasser verdünnt ist (oben p. 193), wäscht sie mit destill. Wasser ab, differenzirt sie in absolutem Alkohol, der höchstens 1/10 % Salzsäure enthält, bis kaum noch Farbe ausgezogen wird, färbt sie dann 1—3 Stunden in Gentianaviolett (entweder in sehr starker wässeriger Lösung oder nach Gram, s. p. 195), wäscht sie rasch in destillirtem Wasser aus und lässt nun eine recht starke wässerige Lösung von Orange auf sie wirken, die als saurer Farbstoff das meiste Violett wegnimmt. Nach höchstens einigen Minuten bringt man die Schnitte in absoluten Alkohol, bis sie kaum noch Farbe abgeben, von da in Nelken- oder Bergamottöl und schliesst sie in Dammar oder Balsam ein, bevor noch die letzten hellen Farbwolken ganz verschwunden sind.

Das Orange wirkt hierbei nach Flemming theils als Farbstoff, theils als Differenziator. Flemming nennt übrigens sein Verfahren mit Recht ein „eigenthümliches und noch räthselhaftes“. Ausserdem ist es sehr komplizirt und aus allen diesen Gründen zur allgemeinen Verwendung nicht geeignet.

Aehnliches gilt von **Reinkes Modifikation** des Orange nach Flemming (Arch. Mikr. Anat. 44. Bd. 1894 p. 262 und 283), die nach dem Safranin mit einer Lösung des „neutralen“ Niederschlages von Gentianaviolett und Orange im Ueberschuss des letzteren färbt. — S. auch BENSLAY (Biol. Bull. Boston Vol. 2 1900 p. 91: Färben mit dem in Alkohol gelösten Niederschlag, Differenziren in Nelkenöl).

312. **Helianthin** (Orange III, Methylorange, Goldorange), zuerst von GRIESBACH (Arch. Mikr. Anat. 22. Bd. 1883 p. 141) empfohlen, wird in wässeriger, mit Essigsäure angesäuerter Lösung von MASSLOW (Arch. Mikr. Anat. 51. Bd. 1897 p. 139) zum Färben des Blutes verwandt: nach dem Vorgang von Kultschitzky färbt er erst mit Hämateïnthonerde, dann mit Rubin (ebenfalls in schwacher Essigsäure gelöst), endlich mit Helianthin; dieses tingirt ausser den Leucocyten auch die Erythrocyten, die ihr Hämoglobin verloren haben. — S. auch unten § 853 (CUÉNOT).

313. **Metanilgelb** (GRIESBACH in: Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 448), ferner **Säuregelb (Echtgelb), Tropäolin O, Croceïn etc.** (GRIESBACH in: Arch. Mikr. Anat. 22. Bd. 1883 p. 132).

314. Säurefuchsin (Fuchsin S, Rubin S, Säurerubin, Magenta S). Es ist das saure Natron- oder Ammoniaksalz einer Rosanilin- oder Pararosanilinsulfosäure. Da die neutralen Salze farblos sind, so ist es äusserst empfindlich gegen Alkalien, und man kann Ueberfärbungen bereits durch Auswaschen mit Brunnen- oder Leitungswasser korrigiren (umgekehrt schwache Färbungen durch Essigsäure verstärken; s. auch unten p. 214). Im Grossen und Ganzen scheinen Fuchsin S und Rubin S gleich zu wirken, s. jedoch § 758.

In Verbindung mit Methylenblau hat das Säurefuchsin bereits Ehrlich (Zeit. Klin. Med. 1. Bd. 1880 p. 558) angewandt.

Es ist einer der besten Plasmafarbstoffe und wird in wässeriger Lösung, die man mit Vortheil nur ganz schwach nimmt (1 : 500, hält sich bei Zusatz von etwas Formol Jahre lang), zur Nachfärbung von Schnitten verwandt, deren Kerne man vorher zweckmässig mit Hämalaun (oder Methylgrün) tingirt hat. Auch Gemische dieser beiderlei Farbstoffe sind bequem zu benutzen. S. ferner die folgenden §§. Auch zum Färben der Nerven ist es wichtig (§ 695, 720 u. 758).

Squire (Methods p. 42) bringt die mit Hämalaun gefärbten Schnitte in eine Lösung von 1 g Säurefuchsin und 6 g Orange G in 60 ccm Alkohol und 240 ccm Wasser. — Aehnlich Monti (Mem. Ist. Lomb. Milano Vol. 9 1899 p. 119): Färbung in Hämalaun und Säurefuchsin, nachher Orange. — Die Methode von Cavazzani (*Riforma Med. Napoli 1893 p. 604; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 344) ist gar komplizirt.

315. Säurefuchsin und Pikrinsäure. Diese Kombination ist, wie es scheint, auf van Gieson (1889) zurückzuführen, der aber keine genaue Vorschrift gegeben hat. In der That spielen die exakten Proportionen beider Bestandtheile keine grosse Rolle. Zu 100 Theilen einer gesättigten Lösung von Pikrinsäure setze man z. B. 5 Theile einer 1 %igen Lösung von Säurefuchsin (Trans. Amer. Micr. Soc. Vol. 19 1898 p. 105). S. auch Möller (Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1898 p. 172), Hansen (Anat. Anzeiger 15. Bd. 1898 p. 151: Zusatz einer Spur Essigsäure) und Schaffer (Zeit. Wiss. Z. 66. Bd. 1899 p. 236).

Die Methode ist natürlich nur für Schnitte brauchbar, und die Kerne werden auch hier mit Hämalaun vorgefärbt. Man kann jedoch mit Ohlmacher (*Journ. Exp. Med. Vol. 2 1897 p. 675) dafür Gentianaviolett nehmen. — S. auch unten § 717 (Finotti).

Apáthy (Behrens, Tabellen 3. Aufl. 1898 p. 129) löst in 500 ccm einer gesättigten Lösung von Ammoniumpikrat 1 g Säurefuchsin auf und färbt damit die mit Hämalaun vorgefärbten Schnitte nach.

Sehr kurzes Abspülen in Wasser mit etwas Pikrat, dann in 90 %igem Alkohol.

Ueber analoge Färbungen s. unten p. 224 (CALLEJA) und § 883.

316. Triacidgemisch von Ehrlich. Der Name dieses Gemisches deutet darauf hin, dass es aus 3 im Sinne Ehrlichs sauren Farbstoffen zusammengesetzt ist, wie das beim Gemisch C (§ 333) wirklich der Fall ist. Indessen hat Ehrlich es nach brieflicher Mittheilung an Mayer (s. auch EHRLICH & LAZARUS, Anämie 1. Abth. Wien 1898 p. 26) deswegen so genannt, weil in ihm alle 3 basischen Gruppen des Methylgrüns mit den sauren Farbstoffen verbunden sind (»triacide Verbindung« des Methylgrüns).

Die neueste Vorschrift (ibid. p. 28) lautet wie folgt: Von Orange G, Säurefuchsin und Methylgrün bereitet man gesättigte wässerige Lösungen und klärt sie durch langes Stehenlassen. Dann mischt man genau in der angegebenen Reihenfolge 13—14 ccm des Orange, 6—7 des Säurefuchsins, 15 dest. Wasser, 15 Alkohol, 12½ des Methylgrüns, 10 Alkohol und 10 Glycerin, wobei man ein und dasselbe Maassgefäss benutzt und vom Zusatz des Methylgrüns ab die Flüssigkeit gründlich schüttelt. Das Gemisch ist sofort brauchbar und hält sich lange gut.

Eine mir (MAYER) von Ehrlich Ende November 1898 zugegangene Probe seines Triacids hat jetzt, also nach 2 Jahren, doch etwas abgesetzt. Ich habe gleich damals von der mitgesandten gesättigten Lösung von Fuchsin S — es ist das Ammoniaksalz — festgestellt, dass sie etwa 26 % feste Substanz enthielt (während sich doch von der letzteren hier in 1 ccm Wasser beinahe ½ g löste, wobei das Volum auf etwa 1,3 ccm zunahm). Unter Berücksichtigung nun des Faktums, dass sich in Neapel von Methylgrün 1 g in etwa 12 ccm Wasser, von Orange 3 g in etwa 20 ccm lösen, gebe ich folgende relativ einfache Vorschrift: 1 g Methylgrün, 2 g Orange und 3 g Säurefuchsin werden in 80 ccm Flüssigkeit (45 ccm Wasser, 10 Glycerin, 25 Alkohol von 90 %) gelöst, und zwar am besten erst die beiden sauren Farbstoffe, nachher das Methylgrün. Dieses Gemisch hat sich bisher ganz klar gehalten. Mir scheint es genau so gut zu färben wie das echte Ehrlichsche. (Nimmt man zum Lösen nur Wasser, also 80 ccm, so bilden sich später auf der Oberfläche Kristalle, dagegen lässt sich das Glycerin durch Alkohol ersetzen.)

Im Wesentlichen färbt das Triacid wie die in den Kreisen der Histologen ungleich bekanntere Abart desselben, das Gemisch von Biondi (s. § 317), von dem es sich aber vortheilhaft durch die bessere Haltbarkeit unterscheidet.

HEIDENHAIN (Morph. Arb. Schwalbe 7. Bd. 1897 p. 243) überfärbt mit dem Triacid die Schnitte, wäscht sie 12—24 Stunden lang in absolutem Alkohol aus und erhält so seine Centralkörper schwarz, die Cytomikrosomen rosenroth.

Die älteste Vorschrift von Ehrlich (* Charité-Annalen 1884 p. 110) findet sich in Israels Praktikum d. path. Hist. (2. Aufl. Berlin 1883 p. 68) abgedruckt, ferner in: Arch. Path. Anat. 105. Bd. 1886 p. 517 (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 234). Sie schreibt aber noch kein Glycerin vor. Eine neuere steht in: Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 259.

Ueber das Gemisch von Cuénot (mit Orange III) s. unten § 853.

317. Gemisch von Ehrlich, Biondi oder R. Heidenhain (Arch. Phys. Pflüger 43. Bd. 1888 Suppl. p. 40; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 520). Es ist nicht leicht herzustellen, aber fertig bei Grübler & Hollborn zu haben.

Nach der ältesten Vorschrift giesst man unter Umrühren zu 100 ccm einer gesättigten wässerigen Lösung von Orange 20 ccm einer ebensolchen Lösung von Säurefuchsin und 50 ccm von Methylgrün und verdünnt das Gemisch mit dem 60—100fachen an Wasser; es muss nun bei Zusatz von Essigsäure roth werden, ferner muss ein Tropfen auf Filtrirpapier einen in der Mitte blaugrünen, am Rande orangegelben Fleck geben; ist nach aussen vom Orange noch eine breitere rothe Zone vorhanden, so enthält das Gemisch zu viel Säurefuchsin.

Nach Krause (Arch. Mikr. Anat. 42. Bd. 1893 p. 59) lösen sich in 100 ccm Wasser ungefähr je 20 g Rubin S, 8 g Orange G und 8 g Methylgrün (die Farbstoffe stammen aus der Aktiengesellschaft für Anilinfabrikation in Berlin; s. jedoch in § 316 meine hiervon abweichenden Angaben, die gleichfalls auf Material aus dieser Bezugsquelle basiren). Von den konzentrirten Lösungen nun giesst man vorsichtig 4 ccm der ersten, 7 der zweiten und 8 der dritten zusammen und gewinnt so die klare Stammlösung, die man beim Gebrauch mit Wasser auf das 50—100fache verdünnt. Vor der Färbung bringt man vortheilhaft die Paraffinschnitte auf 1—2 Stunden in eine $^1/_5$ %ige Essigsäure, färbt sie 24 Stunden lang und wäscht sie dann direkt mit 90%igem Alkohol, der auf je 100 ccm 2—4 Tropfen Essigsäure enthält, aus. — Thomé (ibid. 52. Bd. 1898 p. 821) mischt die konz. Lösungen im Verhältniss von: Rubin 2, Orange 5, Methylgrün 8 und verdünnt beim Färben mit Wasser auf das 100fache, säuert auch eventuell mit einer Spur Essigsäure an.

Nach M. Heidenhain (Festschr. Kölliker Leipzig 1892 p. 116; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 202) hat man zu nehmen Orange G, Rubin S und Methylgrün OO, und zwar müssen alle drei unbedingt von der oben erwähnten Bezugsquelle stammen.

Israel (Praktikum Path. Hist. 2. Aufl. Berlin 1893 p. 69) gibt nach mündlicher Mittheilung von R. Heidenhain folgende Vorschrift zur Bereitung des Gemisches: das von Grübler & Hollborn zu beziehende Pulver löst man in destill. Wasser zu einer 12%igen Stammlösung auf, verdünnt 1 ccm davon mit 30 ccm Wasser, gibt 3 ccm einer $^1/_2$ %igen wässerigen Lösung von Säurefuchsin hinzu und säuert das Gemisch mit 5—6 Tropfen Essigsäure (1 Eisessig : 500 Wasser) an. Die gefärbten Schnitte kommen direkt in Alkohol von 90%.

Die starken Lösungen, wie sie oben verzeichnet sind, liefern bei der Mischung leicht Präzipitate; SQUIRE (Methods p. 37) empfiehlt daher, sie vorher zu verdünnen, gibt übrigens selber wieder andere Proportionen zwischen den 3 Farbstoffen an.

Die Methode gilt nur für Schnitte. Diese werden 6—24 Stunden lang gefärbt, mit Alkohol entwässert und dann durch Xylol in Xylolbalsam übergeführt. Die hauptsächlichste Schwierigkeit dabei ist, dafür zu sorgen, dass der Alkohol nicht das Methylgrün auszieht. Ist übrigens (s. HEIDENHAIN in: Arch. Mikr. Anat. 35. Bd. 1890 p. 178) der Alkohol leicht alkalisch, so wird dadurch im Schnitte das Roth relativ blass, das Grün relativ stark; ist er leicht sauer, so tritt das Gegentheil ein. Auch wirkt das Fuchsin S in alten Lösungen oft schwächer als sonst; dann muss man von ganz schwacher Essigsäure so viel zusetzen, bis das Roth der Lösung merklich stärker geworden ist.

Alle diese Vorsichtsmaassregeln sichern die korrekte Wirkung des Färbgemisches noch nicht, besonders wenn es sich um die Attraktionssphären und andere achromatische Elemente handelt. HEIDENHAIN (Festschr. Kölliker p. 116) gibt daher genauere Instruktionen, die im Wesentlichen darauf hinauslaufen, dem Gemisch die richtige Stärke an Säure zu verleihen, damit besonders das Säurefuchsin weder prävalire noch auch zurücktrete.

Dies wird durch äusserst vorsichtigen Zusatz von Essigsäure erreicht. Ferner bringt man auch die Schnitte vor dem Färben ein paar Stunden lang in $^1/_{10}$%ige Essigsäure, dann 10—15 Minuten lang in offizinelle Jodtinktur, spült sie mit Alkohol ab und lässt sie nun im Färbgemisch 12—18 Stunden verweilen. Nachher spült man sie der Reihe nach kurz mit destillirtem (oder ganz schwach angesäuertem) Wasser, absol. Alkohol und Xylol ab und schliesst sie in Xylolbalsam ein. Die Säure soll dazu dienen, dass die Schnitte noch sauer in den Balsam kommen, das Jod soll nicht nur alles Quecksilber aus den Geweben entfernen, sondern auch das Grün im Chromatin verstärken und eine elektivere Färbung des Plasmas zu Stande bringen.

Der richtige Säuregrad ist übrigens so wichtig, dass man nach HEIDENHAIN (Arch. Mikr. Anat. 43. Bd. 1894 p. 430) das Gemisch nicht filtriren darf, weil es dadurch an Säure verlieren kann. Auch nehmen alte Lösungen Alkali aus dem Glase auf, und man solle sie daher wieder etwas ansäuern oder noch besser in Metall- oder Kautschukflaschen aufbewahren!

EISEN (Proc. California Acad. Sc. (3) Vol. 1 1897 p. 8) empfiehlt zum Ansäuern der Lösung und zum Auswaschen Oxalsäure. — CARAZZI (Manuale p. 78) wäscht die Schnitte nach dem Färben mit verdünntem Glycerin ab und bringt sie dann sofort in absoluten Alkohol.

TRAMBUSTI (Ricerche Lab. Anat. Roma Vol. 5 1896 p. 82; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 347) färbt die mit Essigsäure angesäuerten Schnitte 24 Stunden

lang in einem Gemisch von 1 Theil Biondischen Gemisches (1 : 80), 150 Theilen Wasser und $2^1/_2$ Theilen $1^0/_0$iger Essigsäure.

Drüner (Jena. Zeit. Naturw. 29. Bd. 1894 p. 276) hingegen weicht bedeutend von den anderen Forschern ab: er färbt die Schnitte mit dem konzentrirten Gemisch 10 Minuten lang, spült sie flüchtig mit Brunnenwasser ab, bringt sie auf 1 Minute in absoluten Alkohol mit $^1/_{10}$% Salzsäure, dann in reinen absoluten Alkohol und erhält so das Chromatin blauschwarz, das Plasma intensiv roth.

Es versteht sich von selbst, dass ein Färbgemisch, das schon bei seiner Zusammensetzung so viel Schwierigkeiten bereitet und wohl nicht einmal in zwei Laboratorien genau gleich sein wird, das ferner solche Anforderungen an die Behandlung der Objekte vor und nach dem Färben stellt, und das endlich allermeist sehr vergängliche Färbungen liefert, nur für ganz specielle Fälle brauchbar ist.

Krause (Arch. Mikr. Anat. 49. Bd. 1897 p. 709) hält dagegen die Methode für leicht, sicher und vielfacher Anwendung fähig. Nur muss man wirklich konzentrirte Lösungen der 3 Farben nehmen, und diese selber müssen aus der Berliner Fabrik stammen (s. oben p. 213), während die Zusammensetzung der Stammlösung und der Grad ihrer Verdünnung beliebig variiren dürfen. Ganz ungeeignet ist Material aus Osmiumgemischen, Platinchlorid oder Salpetersäure, am besten das aus Sublimat (ohne oder mit Essigsäure).

Andererseits kann nicht geleugnet werden, dass gut gelungene Präparate gleich auf den ersten Blick Vieles erkennen lassen, was nach anderen Methoden nur mühsam oder gar nicht hervortritt, und dass man durch eine einzige Tinktion wenigstens 3 sehr von einander abstechende Farben erhält. Dafür liegt nun wieder die Gefahr sehr nahe, falsche Schlüsse zu ziehen, besonders wenn Mischfarben auftreten. Denn diese brauchen durchaus nicht auf wirklichen Verschiedenheiten in den Elementen der Objekte zu beruhen, sondern mögen ebenso oft, wenn nicht gar häufiger, ungenügendem Auswaschen zu verdanken sein.

In dieser Beziehung ist es theoretisch ohne Zweifel am richtigsten, mit recht schwachen Gemischen zu operiren, aus denen sich die Gewebe selber aussuchen, was ihnen zusagt, und dann die Präparate schleunigst in Balsam zu bringen. Leider finde ich (Mayer), dass mitunter ohne erkennbaren Grund ein Objekt sich dann gar nicht oder nur ganz unvollkommen färbt, z. B. dass die Kerne das Methylgrün absolut nicht annehmen, während sie bei ganz kurzer Behandlung mit dem konzentrirten Gemisch es doch thun, und noch mehr bei Färbung mit Hämalaun.

Fischer (Fixirung etc. p. 150) möchte das Methylviolett, das im Methylgrün steckt, an manchem Misserfolg Schuld sein lassen. Dies ist mir (Mayer)

nicht sehr wahrscheinlich, obwohl bei dem langen Verbleiben der Schnitte im Färbgemisch das Violett Zeit genug zur Wirkung haben dürfte. Ich habe nämlich immer gefunden, dass, wenn die Kerne oder andere Elemente sehr nach Blau hin gefärbt waren, die grüne Farbe durch Abspülen der Schnitte mit Leitungswasser sofort hervortrat; das aber beweist doch nur den zu grossen Einfluss des Säurefuchsins auf die Färbung.

Mir scheint ferner, als ob man gut daran thun würde, von den vielen Unsicherheiten der Methode wenigstens eine, nämlich die der inconstanten Zusammensetzung, zu eliminiren und sich entweder direkt an das Triacidgemisch von Ehrlich in meiner Modifikation (oben p. 212) zu halten oder ein analoges Gemisch eigens auszuprobiren. Alsdann wird wohl auch das ängstliche Ansäuern überflüssig sein.

318. **Dreifachfärbung** nach Galeotti (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 12. Bd. 1895 Sep. p. 26). Nur von theoretischem Interesse: Schnitte von den mit Osmiumsäure und Chlorpalladium fixirten Objekten werden erst mit Säurefuchsin, dann mit Pikrinsäure, endlich mit Methylgrün behandelt, und es färbt sich das Chromatin roth, das Zellplasma gelbgrün, die Granula in letzterem roth etc.

319. **Bordeauxroth.** Es soll nach Griesbach (Arch. Mikr. Anat. 22. Bd. 1883 p. 140) die Kerne färben, wird indessen auf Empfehlung von Heidenhain (ibid. 43. Bd. 1894 p. 665) wohl nur zur Vorfärbung der Schnitte bei der Methode von Benda oder Heidenhain benutzt (s. § 639). Ich (Lee) färbe Schnitte von Chromosmium-Material 12—24 Stunden lang in einer 1%igen Lösung.

Das Dreifarbengemisch von Gråberg (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1897 p. 460) besteht aus 4 Theilen einer 1%igen Lösung von Bordeaux R, 2 Theilen einer ½%igen von Thionin und 3 Theilen einer 1%igen von Methylgrün.

320. **Biebricher Scharlach** liefert eine diffuse hellrothe Färbung, die vielleicht als Kontrast nützlich ist (Griesbach in: Arch. Mikr. Anat. 22. Bd. 1883 p. 140). — Paladino (Rend. Accad. Napoli Anno 34 1895 p. 209) verwendet ihn (als 2%ige wässerige Lösung) im Gemisch mit „Hämatoxylin“, um die Erythrocyten kupferroth gefärbt zu bekommen.

321. **Congoroth** (Griesbach in: Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 379). Ebenfalls ein saurer Farbstoff im Sinne von Ehrlich; die wässerige Lösung reagirt neutral oder alkalisch. Es wird schon durch Spuren von freier Säure blau, ist daher ein gutes Reagens auf freie Säure in Geweben. Es färbt ähnlich wie Säurefuchsin und scheint gleich ihm besonders gut zum Tingiren von Axencylindern zu sein (§ 688 Rehm und 724). Auch kann es zur Färbung intra vitam dienen (§ 206).

Carnoy & Lebrun (La Cellule Tome 12 1897 p. 216) empfehlen eine Doppelfärbung der Schnitte durch Eier von Batrachiern mit Hämateïnthonerde und nachher Congoroth (1 : 200 Wasser), das nur die Kerne nicht färbt. Die Präparate seien in Kolophonium haltbar.

Nach Böhm & Oppel (Taschenbuch 3. Aufl. 1896 p. 155) hat Stintzing im Magen der Säugethiere mit Häm. und Congoroth die Hauptzellen bläulich, die Belegzellen (durch das Congoroth) roth gefärbt erhalten; ferner hat er im

Bindegewebe des Magens von *Sus* durch Auswaschen des Congoroths erst mit Alkohol von 100%, dann von 70% „congophile Zellen" entdeckt, die wohl mit Ehrlichs eosinophilen Zellen identisch sind. (S. auch Festschrift f. Kupffer Jena 1899 p. 54.)

322. **Benzopurpurin.** Nach Griesbach (l. c.) in seiner Wirkung sehr ähnlich dem Congoroth. Nach Zschokke (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 466) färben schwache Lösungen von Benzopurpurin B schon in einigen Minuten; ähnlich wirke **Deltapurpurin.** Beide Farbstoffe seien sehr geeignet zur Plasmafärbung, nachdem die Kerne mit einem Hämalaun tingirt seien. Aehnlich urtheilt Martin (ibid. 6. Bd. 1889 p. 195).

323. **Neutralroth** nach Ehrlich (*Allg. Med. Zeit. 1894 p. 2, 20; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 250; Galeotti, ibid. p. 193). Von Grübler & Hollborn zu beziehen, dient bisher fast nur zum Färben intra vitam: Froschlarven absorbiren nach 1—2 Tagen in einer Lösung von 1 : 10000 oder 1 : 100000 so viel Farbe, dass alle ihre Gewebe dunkelroth sind. Die Färbung ist aber auf die Körner im Zellplasma (Ehrlich) und den Inhalt der Schleimzellen (Galeotti) beschränkt. — Mayer (Lotos Prag 1896 N. 2) erwähnt kurz, dass entweder nach Einsetzen der Larven in Wasser mit Neutralroth oder nach Injiziren von Amphibien und Säugethieren (0,1 g Neutralroth auf 100 ccm $^1/_2$ %iges Salzwasser) sich ausser den Granula in Haut, Knorpel etc. auch degenerirendes Nervenmark färbt.

Nach Ehrlich & Lazarus (Anämie 1. Abth. Wien 1898 p. 85) kann das Neutralroth auch zugleich mit Methylenblau intravital angewandt werden, aber die beiden Farbstoffe wirken doch jeder für sich. Das Optimum der Stärke der Lösung ist 1 : 50000 (Michaelis in: Arch. Mikr. Anat. 55. Bd. 1900 p. 564). — S. auch Plato (ibid. 56. Bd. p. 868) und unten § 882. — Ueber die Färbung des Blutes mit Neutralroth s. Giglio-Tos (Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1898 p. 166).
Ueber Neutralroth als Kernfärbemittel s. § 295.

324. Die Eosine, im Handel als **Eosin** (Alkalisalze des Tetrabromfluoresceïns), **Saffrosin, Primerose soluble, Phloxin, Rose bengale, Erythrosin** (Jodderivat des Eosins), **Pyrosin B, Rose B à l'eau** etc. bekannt, sind sämmtlich Phthaleïn-Farbstoffe. Sie haben nicht ganz die gleichen Eigenschaften, sondern variiren nach den Fabriken. Die meisten sind in Wasser oder Alkohol löslich, einige aber nur in Alkohol (Spriteosin, Primerose à l'alcool). Alle geben übrigens diffuse Färbungen und wurden früher viel als Kontrastfarbstoffe benutzt (s. unten), dienen aber auch in Verbindung mit anderen Farbstoffen (s. § 325 u. 326). — Ueber Rose bengale (mit Jodgrün und Bleu de Lyon) s. Griesbach in: Z. Anzeiger 6. Jahrg. 1883 p. 172.

Ueber Eosin oder Erythrosin als Spezifikum für rothe Blutkörperchen und für gewisse Körner in den weissen s. § 796, für Blut-

plättchen § 798, für Körner in Nervenzellen § 688, 690 u. 691. Auch der Dotter in manchen Eiern nimmt es stark auf. — S. auch § 883.

Das Eosin wurde 1876 von FISCHER (Arch. Mikr. Anat. 12. Bd. 1875 p. 349) in die Mikrotechnik eingeführt; er benutzt das Kaliumsalz, in Wasser gelöst, noch lieber aber die freie Farbsäure, in Alkohol gelöst (eigenthümlicher Weise auch in absol. Alkohol mit Alaun).

Eine sehr gebräuchliche Kombination für Doppelfärbungen ist die mit Eosin und Hämateïnthonerde. In der Regel färbt man die Objekte in toto mit Hämalaun (oder ähnlichen Gemischen) und dann die Schnitte noch einige Minuten lang in einer schwachen wässerigen oder alkoholischen Lösung von Eosin. (STÖHR in: Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 583 verwendet es in konzentrirter Lösung.) Oder man färbt zuerst mit Eosin (so z. B. HICKSON in: Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 35 1893 p. 129; RAWITZ in: Leitfaden 2. Aufl. p. 69). Stets aber müssen die Schnitte vor dem Uebertragen aus der einen Färblösung in die andere gut ausgewaschen werden, da sonst leicht Niederschläge entstehen. Oder endlich man bedient sich des Gemisches von Ehrlich & Lazarus (oben § 251).

Auch für Embryonen eignet sich diese Doppelfärbung: der Dotter nimmt das Eosin energisch auf, während in den Geweben des Embryos das Blau vorherrscht. S. auch LIST (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 148) und BUSCH (Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1878 p. 594).

Zu seinem Gemisch von Hämateïnthonerde und Eosin hat RENAUT nach und nach immer neue Formeln gegeben; die letzte steht in Fols Lehrbuch p. 196. Sie zeichnen sich alle durch Komplikation der Bereitung und Anwendung aus; das Wesentliche dabei ist, dass die Lösung ungemein viel Glycerin enthält, sodass die Gewebe oft erst nach Wochen stark genug gefärbt sind.

325. **Eosin und Methylgrün** nach CALBERLA (Morph. Jahrb. 3. Bd. 1877 p. 625), nach LIST (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 147), nach BALBIANI (Ann. Microgr. Paris Tome 7 1895 p. 245) und nach RHUMBLER (Zeit. Wiss. Z. 61. Bd. 1895 p. 38). Das Methylgrün färbt die Kerne, das Eosin das Plasma.

326. Eosin und Methylenblau. Nach den gewöhnlichen Vorschriften, wie der von CHENZINSKI (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 260), PIANESE (ibid. p. 345), BREMER (Arch. Mikr. Anat. 45. Bd. 1895 p. 446) und TALLQUIST & WILLEBRAND (Skand. Arch. Phys. 10. Bd. 1899 p. 42), dient in diesen Gemischen das Methylenblau als Kernfarbstoff.

Chenzinski mischt 1 ccm $^1/_2$ %ige Lösung von Eosin in 70 %igem Alkohol, 2 ccm gesättigte wässerige Lösung von Methylenblau und 2 ccm Wasser (oder Glycerin). — Nach EHRLICH & LAZARUS (Anämie 1. Abth. Wien 1898 p. 29) hält sich das Gemisch ziemlich lange, muss aber vor dem Gebrauch stets filtrirt werden. (S. auch ibid. ein ähnliches Gemisch mit Methylal statt Wasser.)

Dagegen sollen in den erst neuerdings aufgekommenen Gemischen zum Studium der Malaria-Parasiten und ähnlichen Protozoen (*Plasmodium, Laverania* etc.), die hauptsächlich neben Eosin polychromes Methylenblau nach Unna verwenden oder letzteres erst eigens dabei produziren, die Kerne der Parasiten nicht blau, sondern roth, ihr Plasma nicht roth, sondern blau, und die Kerne der Blutzellen violett werden. Diese sogenannte Methode von Romanowski (1891) beruht nach NOCHT (Centralbl. Bakt. 1. Abth. 24. Bd. 1898 p. 839; ibid. 25. Bd. 1899 p. 17 u. 764) darauf, dass sich im polychromen Methylenblau unter anderen Farbstoffen ein »Roth aus Methylenblau« gelöst befindet, das nun im Verein mit Eosin und normalem Methylenblau die obige Farbenreaktion liefert.

Nocht verdünnt 2 oder 3 Tropfen einer 1%igen Eosinlösung mit 1—2 ccm Wasser und setzt tropfenweise von einem kalten Gemisch aus 1 Th. Methylenblau, 1/2 Th. Natriumkarbonat und 100 Th. Wasser, das einige Tage bei 50—60° C. gestanden hat, so viel hinzu, bis die Eosinlösung als solche nicht mehr zu erkennen ist. Hierin färbt er nur 1 Deckglas, denn schon beim folgenden kommt die Färbung oft gar nicht mehr zu Stande.

WASIELEWSKI & SENN (Zeit. Hyg. 33. Bd. 1900 p. 451) benutzen zur Färbung der Flagellaten des Blutes *(Herpetomonas)* und der Malaria-Halbmonde ein Gemisch der Lösungen von reinem und polychromem Methylenblau und Eosin; Ueberfärbung korrigiren sie durch Auswaschen in ganz schwacher Eosinlösung. Von *H.* färben sich auch die Geisseln roth.

S. auch ZETTNOW (*Zeit. Hyg. 30. Bd. 1899 p. 1; Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd. 1899 p. 254; Anat. Anzeiger 17. Jahrg. 1900 p. 432), ROSIN (*Berlin. Klin. Wochenschr. 1898 p. 251; Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd 1899 p. 223; Centralbl. Phys. 13. Bd. 1900 p. 561—565: über sogenannte neutrale Farbstoffe, speziell „eosinsaures Methylenblau"); LAURENT (Zeit. Wiss. Mikr. 17. Bd. 1900 p. 201), MAURER (Centralbl. Bakt. 1. Abth. 28. Bd. 1900 p. 114) und RUGE (*Zeit. Hyg. 33. Bd. 1900).

Denselben eigenthümlichen Effekt will LAVERAN (C. R. Soc. Biol. Paris (11) Tome 1 1899 p. 250; ibid. Tome 52 1900 p. 549) mit seinem Bleu Borrel erreichen. Er behandelt 7—8 Tage lang eine gesättigte Lösung von Methylenblau mit Silberoxyd (frisch gefällt aus Silbernitrat durch Natriumkarbonat und gut ausgewaschen) und mischt zu 1 ccm hiervon unmittelbar vor dem Gebrauch 4 ccm einer 1/10%igen wässerigen Lösung von Eosin und 6 ccm Wasser. Die gefärbten Präparate bringt er in eine 5%ige wässerige Lösung von Tannin, trocknet sie und gibt Balsam darüber.

327. Lichtgrün S. F. Ein saurer Farbstoff im Sinne von Ehrlich, löslich in Wasser oder Alkohol, werthvoll als Plasmafarbstoff.

BENDA (Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1891 p. 549; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1892 p. 516) färbt Schnitte durch Hoden von Säuge-

thieren 24 Stunden in Safranin, darauf $^1/_2$ Minute in Lichtgrün (oder **Säureviolett**) 1 g auf 400 ccm Alkohol, entwässert sie und schliesst sie in Balsam ein.

Auch nach unseren Erfahrungen sind beide Farbstoffe sehr zu empfehlen, aber ihre Haltbarkeit scheint ziemlich begrenzt zu sein. Speziell das Lichtgrün gibt nach einer rothen Kernfärbung (z. B. mit Karmalaun) scharfe Kontraste, und man thut gut daran, es nicht zu lange einwirken zu lassen.

Peter (Arch. Mikr. Anat. 53. Bd. 1898 p. 183) verwendet das Lichtgrün nach Eisenhämatoxylin.

328. **Janusgrün,** ein Safraninazofarbstoff, dient nach Michaelis (Arch. Mikr. Anat. 55. Bd. 1900 p. 565) zur optischen Hervorhebung von Zellkörnelungen in frischen Geweben, die in eine Lösung desselben (1 : 3000 in Normalsalzwasser) eingelegt werden.

329. **Jodgrün (Hofmanns Grün)** nach Griesbach (Z. Anzeiger 5. Jahrg. 1882 p. 406). Färbt im Wesentlichen wie Methylgrün, ist aber oft stark mit einem violetten Farbstoff verunreinigt und färbt dann das Plasma violett (Mayer in: Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 311).

Fischer (Fixirung etc. p. 89) geht mit seiner Behauptung, Jodgrün gebe es gar nicht mehr, und was man als solches verkaufe, sei nur Methylgrün, zu weit; aber entbehrlich ist es jedenfalls, wird auch in erster Linie nur von den Botanikern benutzt.

330. **Anilingrün** soll nach Schiefferdecker (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 51 u. 223) und nach List (ibid. p. 222) besonders gut den Schleim färben, aber schon damals müssen Differenzen in der Art des Farbstoffes bestanden haben, und gegenwärtig ist es wohl kaum noch möglich, seine richtige Benennung zu ermitteln.

Thiophengrün rühmt Krause (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 4. Bd. 1887 p. 73), **Cörulein S** Lenhossék (Anat. Anzeiger 16. Bd. 1899 p. 339).

331. **Malachitgrün.** Maas (Zeit. Wiss. Z. 50. Bd. 1890 p. 530) benutzt es in schwacher alkoholischer Lösung zum Nachfärben der Schnitte, die mit Boraxkarmin vorgefärbt worden sind.

332. **Indulin, Nigrosin, Indigen, Coupiers Blau, Echtblau R oder B, Blackley Blue, Guernsay Blue** u. s. w. Alle diese Farbstoffe werden nur in speziellen Fällen verwandt, besonders bei der Untersuchung des Nervensystems; so z. B. Pikronigrosin (d. h. Nigrosin und Pikrinsäure), s. § 728, aber auch für Bindegewebe, s. § 767.

Calberla (Morph. Jahrb. 3. Bd. 1877 p. 627) färbt mit der konzentrirten wässerigen Lösung von **Indulin,** die mit dem Sechsfachen an Wasser verdünnt worden ist, Schnitte 5—20 Minuten lang, wäscht sie in Wasser oder Alkohol aus und studirt sie in Glycerin oder Nelkenöl. Die Kerne färbt es nach Calberla nie, wohl aber das Plasma und die Intercellularsubstanzen.

Ueber Nigrosin und Safranin s. Kossinski (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 61).

333. Indulin-Aurantia-Eosin (Ehrlichs Gemisch C oder **acidophiles Gemisch**). Nach der mir (Lee) von Grübler angegebenen Formel löst man je 2 g Indulin, Aurantia (Hexanitrodiphenylamin) und Eosin in 30 g Glycerin; entweder lässt man auf der dicken Lösung die Deckglas-Präparate schwimmen oder gibt einige Tropfen auf die Schnitte und lässt den Objektträger horizontal liegen, bis die Färbung gut ist (bei Material aus Flemmings Gemisch 24 Stunden lang). Ehrlich hat das Gemisch für Leucocyten erdacht, Nikiforoff (Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 189; 11. Bd. 1894 p. 246) und Bensley (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 41 1898 p. 376) auf Schnitte angewandt. Ich (Lee) finde, sie ist gut dafür; Material aus Flemmings Gemisch färbt sich kräftig damit, und die Farbe hält sich im Alkohol viel besser als die mit Ehrlich-Biondis Gemisch, taugt also für gewöhnliche Untersuchungen mehr. Meine Objekte färben sich im Allgemeinen wie mit Hämateïn-Thonerde (die Kerne dunkelblau, das Plasma hellblau, wo es nicht das Aurantia oder Eosin aufgenommen hat). Die Färbung soll sich gut halten.

Israel (Praktik. Path. Hist. 2. Aufl. Berlin 1893 p. 68) gibt eine komplizirte Art der Bereitung nach mündlicher Mittheilung von Ehrlich an.

Fischer (Fixirung etc. p. 137) verdammt das Gemisch in Grund und Boden.

334. Chinolinblau (Cyanin). Ranvier (Arch. Phys. Paris (2) Tome 1 1874 p. 786; Traité 1. Ed. p. 58 u. 102) löst es in 90%igem Alkohol und verdünnt die Lösung mit dem gleichen Quantum Wasser. Es färbt in sehr schwacher Lösung die Kerne violett, das Plasma blau, Fett dunkelblau etc. In Glycerin bleibt nur das Fett gefärbt. — Nach den Reaktionen, die R. angibt, scheint dieses Chinolinblau nicht das zu sein, das gewöhnlich unter diesem Namen geht, wie auch bereits Ehrlich (Arch. Mikr. Anat. 13. Bd. 1877 p. 266) bemerkt.

Certes hat es zum Färben von Infusorien intra vitam benutzt (§ 874).

335. Anilinblau. Hierher gehören mehrere basische Derivate des Rosanilins, die im Handel als **Spritblau, Gentianablau 6 B, Opalblau, Bleu de nuit, Bleu lumière, Parmablau, Bleu de Lyon** etc. gehen. Die Vorschriften älterer Forscher zum Färben mit Anilinblau kann man wohl ausser Acht lassen, denn es wird kaum möglich sein, die damals benutzten Farbstoffe zu bekommen oder auch nur zu ermitteln, was sie eigentlich gewesen sind.

Der einzige von den oben genannten Farbstoffen, der wirklich gut zu sein scheint, ist **Bleu de Lyon.** (Man gibt auch wohl Bleu de Nuit und Grünlichblau als Synonyma dazu an.) Allerdings in starker Lösung färbt es das Chromatin, in schwacher dagegen zunächst das Plasma, und so ist es nach Kernfarbstoffen wie Karmin gut zu brauchen.

Baumgarten (Arch. Mikr. Anat. 40. Bd. 1892 p. 515) färbt Schnitte von Knorpel und Nervensystem (nach der Stückfärbung mit Boraxkarmin) 12 Stunden lang mit einer $^1/_5$%igen Lösung von Bleu de Lyon in absolutem Alkohol, wäscht sie 6 Stunden lang aus und bringt sie dann in Balsam.

Tonkoff (Arch. Mikr. Anat. 56. Bd. 1900 p. 394) gibt zur Lösung des Bleu de Lyon in 96 %igem Alkohol etwas Jodtinktur oder beizt die Schnitte damit; die Färbung soll dann rascher von Statten gehen.

Eine komplizirte Methode zur Färbung mit Anilinblau und Safranin hat Garbini (Z. Anzeiger 9. Jahrg. 1886 p. 27; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 170) angegeben. Bei ihr wird das Anilinblau in den Schnitten erst durch 1%ige Lösung von Aetzammoniak oder Lithiumkarbonat beinahe entfärbt, dann durch Salzsäure wieder hervorgerufen. — Fiedler (Zeit. Wiss. Z. 47. Bd. 1888 p. 88) differenzirt die mit Bleu de Lyon diffus gefärbten Schnitte durch die Eier von Poriferen mit ammoniakhaltigem Alkohol so lange, bis nur noch die Dotterkörner gefärbt bleiben.

336. Methylblau. Hierher gehören einige andere Derivate des Rosanilins. Es sind saure Farbstoffe (meistens Natronsalze von Sulfosäuren); im Handel gehen sie als **Methylblau, Baumwollblau, Wasserblau, Methylwasserblau, Chinablau, lösliches Blau** etc.

Das **Wasserblau** gibt nach Mitrophanow (Zeit. Wiss. Mikr. 5 Bd. 1888 p. 513) in konzentrirter Lösung eine sehr gute Doppelfärbung mit Safranin. Es hält sich in Alkohol sehr gut. Da es sehr leicht zu verwenden ist, so lässt es sich wohl empfehlen, aber man nehme es stets vor dem Safranin, sonst zieht es dieses rasch aus. Mann (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 490) verwendet es mit Eosin zum Färben von Ganglienzellen (s. unten § 688).

Hofmann (Z. Jahrb. Abth. Syst. 12. Bd. 1899 p. 176) behandelt die mit Eosin vorgefärbten Schnitte von *Distomum* mit einer Lösung von Wasserblau (triphenylrosanilintrisulfosaurem Kalk) in gesättigter Lösung von Pikrinsäure und nennt dies Verfahren eine modifizirte Giesonsche Methode!

337. Anilin-Blue-Black. Dieses haben Bevan Lewis und Andere zum Färben von Nervengewebe empfohlen, geben aber leider nichts Genaueres über seine chemische Konstitution an, sodass man nicht weiss, ob sie das **Blauschwarz B** oder das **Anilinschwarz** von Lightfoot meinen, das auch als **Nigranilin** und **Noir Colin** bekannt ist. Grübler schreibt mir (Lee), sein Blue-Black sei das Blauschwarz B, früher auch Azoschwarz (aus der Badischen Anilinfabrik) genannt; das Nigranilin und Noir Colin seien nicht mehr im Handel.

338. Patentblau (bleu carmin bréveté N., von den Höchster Farbwerken). Nach Janssens (La Cellule Tome 9 1893 p. 9) zeigt es besondere Verwandtschaft zu den Theilen des Zellplasmas, die sich zur Cuticula differenziren. Er braucht es in angesäuerter alkoholischer Lösung. Es hält sich in Balsam.

Nach meinen (Mayer) Erfahrungen mit einer mir von H. Lebrun gegebenen Probe färbt es beispielsweise Chitin durchaus nicht elektiv, sondern schwächer als die Muskeln, färbt auch die Kerne. Es wird durch Alkohol roth, durch Säuren wieder blau. Die Höchster Farbwerke theilen mir mit, der Farbstoff sei sehr wahrscheinlich das Patentblau (bleu carmin brévété).

339. Ueber **Benzoazurin** nach Zschokke (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 468) und Martin (ibid. 6. Bd. 1889 p. 193) s. oben § 292.

340. Methylviolett (Violett B) wendet Mayer (Sitzungsb. Akad. Wien 85. Bd. 3. Abth. 1882 p. 70) in einer $^1/_8$%igen Lösung in $^1/_2$%igem Salzwasser auf frisches Gewebe (Mesenterium und Serosa von Säugethieren, Hyaloidea des Auges von *Rana)* an; die Blutgefässe treten dadurch so lebhaft wie in einem Injektionspräparat hervor. — Die Färbung lässt sich nach Mayer (Anat. Anzeiger 7. Jahrg. 1892 p. 221) durch Einschluss der Präparate in Glycerin mit Ammoniumpikrat (§ 305) einigermaassen konserviren. — Die metachromatische Färbung des Knorpels (und Amyloids) scheint zuerst Cornil (C. R. Acad. Sc. Paris Tome 80 1875 p. 1288) bemerkt zu haben.

341. Kresylviolett R. Es färbt nach Ehrlich & Lazarus (Anämie 1. Abth. Wien 1898 p. 51) in den Mastzellen die Körner metachromatisch fast rein braun.

Bielschowsky & Plien (Neur. Centralbl. 19. Jahrg. 1900 p. 1141) verwenden zum Färben der Nervenzellen das Kresylviolett R R in ganz schwacher wässeriger Lösung. Die Schnitte bleiben darin 24 Stunden.

Herxheimer (Arch. Mikr. Anat. 53. Bd. 1899 p. 519; ibid. 54. Bd. p. 289) empfiehlt zum Färben von Schnitten durch Haut **Kresylechtviolett,** das die Kerne blau, das Plasma röthlich tingirt.

Ueber **Säureviolett** s. oben p. 220.

342. Fuchsin und Methylenblau nach Baumgarten (Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 315). Schnitte von Material aus Chromgemischen werden 24 Stunden in Fuchsin (8—10 Tropfen der konzentrirten alkoholischen Lösung auf ein Uhrglas voll Wasser) gefärbt, mit Alkohol abgespült, dann 4—5 Minuten in einer konzentrirten wässerigen Lösung von Methylenblau gefärbt, mit Alkohol 5—10 Minuten ausgewaschen und durch Nelkenöl in Balsam gebracht. Kerne roth, das übrige Gewebe blau (das Methylenblau hat das Fuchsin vertrieben, was Alkohol allein, ob neutral oder sauer, nicht vermag).

343. Alizarin nach Rawitz (Anat. Anzeiger 11. Jahrg. 1895 p. 294). Rawitz hat eine Methode für eine Doppelfärbung mit künstlichem Alizarin oder mit Alizarincyanin ausgearbeitet; diese erfordert aber spezielle Beizen, die man von den Verfertigern der Farbstoffe selber beziehen muss, ist äusserst komplizirt und kostet wenigstens mehrere Tage Zeit.

S. auch oben § 277 über die adjektive Plasmafärbung mit Kernfarbstoffen.

344. Purpurin nach Ranvier (Arch. Phys. Paris (2) Tome 1 1874 p 761; Traité techn. 1. Ed. p. 280; Duval, Précis techn. hist. p. 221). Künstliches Purpurin wird in Alaunlösung gelöst. Grenacher (Arch. Mikr. Anat. 16. Bd. 1879 p. 470) löst den Alaun in Glycerin.

Nach meinen (Mayer) Erfahrungen ist die Färbung zu schwach, um nützlich zu sein.

345. Indigkarmin. Die einfachen wässerigen Lösungen färben diffus und taugen daher allein nicht, wohl aber in Verbindung mit Karmin zur Doppelfärbung. Man kann dabei entweder mit einer Karminlösung vorfärben oder beide Farbstoffe gleichzeitig anwenden, indem man z. B. nach MAYER (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 320) eine Lösung von 1 g Indigkarmin in 500 ccm Wasser (oder 5%iger Alaunlösung) mit dem 4—20fachen an Karmalaun (oder Hämalaun) vermischt. Das Indigkarmin färbt dann weder die Kerne noch den Schleim, wohl aber das Plasma und ist in Balsam haltbar. Die wässerige Lösung des Indigkarmins hält sich bei grellem Lichte nur wenige Monate; dagegen ist die in Alkohol von 70% (1 : 200) Jahre lang haltbar.

SEILER (Amer. Q. Micr. Journ. Vol. 1 1879 p. 220; Journ. R. Micr. Soc. London Vol. 2 1879 p. 613) färbt mit Boraxkarmin, differenzirt in saurem Alkohol, wäscht gut mit neutralem Alkohol aus und färbt mit einer äusserst schwachen alkoholischen Lösung von Indigkarmin (2 Tropfen einer gesättigten wässerigen Lösung auf 30 ccm Alkohol) nach.

Karmin und Indigkarmin nach MERKEL (*Unters. Anat. Inst. Rostock 1874; ferner NORRIS & SHAKESPEARE in: *Amer. Journ. Med. Sc. 1877; BAYERL in: Arch. Mikr. Anat. 23. Bd. 1885 p. 36; *MACALLUM in: Trans. Canad. Inst. Vol. 2 1892 p. 222). Nach MAYER (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 320) ist die Vorschrift ganz irrationell, unpraktisch und gibt auch eine stark alkalische, mithin den Geweben schädliche Lösung.

Indigkarmin (1 g), in gesättigter wässeriger Lösung von Pikrinsäure (400 ccm) gelöst, benutzt CALLEJA (Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1899 p. 323) zur Nachfärbung der mit Karmalaun oder einem Karmingemisch vorgefärbten Schnitte. (Fixirung der Plasmafärbung durch rasches Auswaschen in sehr verdünnter Essigsäure.) — SCHIEFFERDECKER (ibid. p. 324) stellt diese Färbung der mit Säurefuchsin und Pikrinsäure (oben § 315) durchaus zur Seite. Sie ist übrigens bereits 1872 von JULLIEN (*Lyon médical N. 17) ausgeübt worden.

Ueber Indigkarmin und Oxalsäure nach THIERSCH s. Arch. Mikr. Anat. 1. Bd. 1865 p. 150.

17. Kapitel.

Färben mit anderen organischen Farbstoffen; Färben und Imprägniren mit Metallen.

346. Kernschwarz. Diese zuerst von Platner (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 350) angewandte Flüssigkeit, die bei Grübler & Hollborn zu haben ist, hat Mayer (Lee & Mayer 1. Aufl. p. 202) als eine Eisentinte (Eisen und Gerbstoff) erkannt.

Platner färbt die Schnitte mit ziemlich stark verdünntem Kernschwarz und wäscht sie mehrere Stunden lang in einem wässerigen Alkali, etwa in verdünntem Ammoniak, besser aber noch in einer Lösung von Lithiumkarbonat (die konzentrirte Lösung mit 3 oder mehr Volumen Wasser vermischt). So werden die Mitosen ganz tief gefärbt, die ruhenden Kerne blasser oder gar nicht, das Zellplasma gar nicht oder nur schwach grau.

Ohne Zweifel ist die Behandlung mit Alkalien den Schnitten nicht zuträglich, und man kann die Ueberfärbung natürlich auch durch Auswaschen mit saurem Alkohol beseitigen. Aehnliche, allerdings nicht so scharfe Färbungen hat Mayer durch Gallussäure in Verbindung mit Eisenchlorid oder Eisenoxydsulfat erhalten.

Man kann (s. auch Lee in: La Cellule Tome 11 1895 p. 31; 1896 p. 257) damit sehr gute Doppelfärbungen erhalten, wenn man die Schnitte aus dem Kernschwarz erst in Wasser, dann in einen Kernfarbstoff (Safranin; aber Gentianaviolett, Viktoriablau oder Hämalaun etc. thun es auch) bringt und das Safranin mit Alkohol (saurem oder neutralem je nach Bedürfniss) und Nelkenöl differenzirt. In diesem Falle wirkt das Kernschwarz aber als Plasmafarbstoff, also nicht ganz nach den Intentionen von Platner.

Die Färbung hält sich in Balsam gut, aber das Kernschwarz selber setzt nach meinen (Mayer) Erfahrungen sehr bald stark ab. Nach mir (Lee) hingegen hält es sich unbegrenzt lange.

347. Brasilin, das wirksame Prinzip des Roth- oder Fernambukholzes, das dem Hämatoxylin des Blauholzes entspricht und sich, wie dieses sich zu Hämateïn, zu Brasileïn oxydirt, wird von Eisen (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897

p. 198) warm empfohlen. Es soll „be mixed as Böhmer's Haematoxylin“, wird gleich diesem erst nach einigen Wochen gebrauchfähig und verdirbt ebenfalls sehr rasch durch Bildung eines Niederschlages. Dieser aber eigne sich nach Auflösung in Alkohol von 95 % (mit 15 oder mehr % Glycerin) noch viel besser zum Färben.

Nach meinen (Mayer) oft variirten Versuchen, die ich schon seit Jahren immer wieder aufgenommen habe, färbt das Brasilin in Verbindung mit Alaun zwar ähnlich, aber lange nicht so intensiv wie Hämalaun oder Karmalaun, ist daher wenigstens als Kernfärbmittel entbehrlich.

Schaudinn (Anh. Abh. Akad. Berlin 1899 p. 11) färbt Schnitte durch Rhizopoden erst mit Methylenblau, dann mit „Brasilin“ (nähere Angaben fehlen): Kerne roth, Plasma rosa, Fremdkörper blau.

Heimann (Arch. Path. Anat. 152. Bd. 1898 p. 328) stellt die Lösung analog dem Hämatoxylin von Delafield her und benutzt sie zur Färbung von Ganglienzellen. — S. auch oben p. 178 (Hickson).

348. Orceïn nach Israel (Arch. Path. Anat. 105. Bd. 1886 p. 169; Praktik. Path. Hist. 2. Aufl. Berlin 1893 p. 72). Aus der Flechte *Lecanora parella* wird Orcin gewonnen, und dieses geht bei Einwirkung von Ammoniak und Luft in das braune, amorphe Orceïn über. Letzteres soll die färberischen Eigenschaften eines sauren und eines basischen Farbstoffs vereinigen. Israel färbt Schnitte mit einer Lösung von 1 g Orceïn in 1 g Eisessig und 50 ccm Wasser, wäscht sie in Wasser ab und bringt sie rasch durch absoluten Alkohol in dickes Cedernöl, worin die Präparate definitiv eingeschlossen bleiben. Kerne blau, Plasma roth. — Die Methoden zur Färbung von Bindegewebe mit Orceïn s. § 777; über die **Orseille** nach Wedl (Arch. Path. Anat. 74. Bd. 1878 p. 143) s. die früheren englischen Auflagen dieses Buches und Fols Lehrbuch p. 192.

S. auch Laurent (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 302) und Ružička (ibid. 14. Bd. 1898 p. 455: Orceïn und Gerbsäure).

Heimann (Arch. Path. Anat. 152. Bd. 1898 p. 328) färbt Ganglienzellen „subjektiv“ mit einer „nach Analogie des Delafieldschen Hämatoxylin“ hergestellten Lösung.

349. Ueberflüssige vegetabilische Farbstoffe. Ganz veraltet sind das Ribesin von Fol (Lehrbuch p. 183: die Häute von *Ribes nigrum* mit 1 %iger Alaunlösung gekocht), der Farbstoff aus dem Rothkohl nach Tait (*Journ. Anat. Phys. London Vol. 9 1875 p. 250) und Flesch (Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 253), der aus *Vaccinium myrtillus* („Myrtillus“) nach Lavdowsky (Arch. Mikr. Anat. 22. Bd. 1884 p. 506). Kein besseres Geschick verdienen auch offenbar das erst jüngst von Claudius (Zeit. Wiss. Mikr. 17. Bd. 1900 p. 52) empfohlene Brombeerroth, Hollunderroth etc., die alle, mit einer Spur Schwefelsäure versetzt, als Kernfarbstoffe dienen sollen.

Ich (Mayer) habe in Saft von schwarzen Kirschen 5 %igen Alaun aufgelöst und finde, das Gemisch färbt ähnlich dem Hämalaun, aber lange nicht so intensiv. Es ist daher gleichfalls überflüssig.

350. Charakter der Imprägnirfärbungen. Unter Imprägnation versteht man (s. Apáthy in: Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 17) die Art der Färbung, bei der die Färbmaterie in den Gewebelementen als ein körniges Präzipitat abgelagert wird, so dass die imprägnirten Gewebe undurchsichtig werden. Unter Tinktion versteht man hingegen die Färbung, bei der die Färbmaterie von den Geweben wie gelöst zurückgehalten wird, mithin unter dem Mikroskop keine soliden Partikeln zeigt, sodass die Gewebe durchsichtig bleiben. Indessen lässt sich, wie ausdrücklich bemerkt sein mag, zwischen diesen beiden Arten keine scharfe Grenze ziehen: mehrere von den hier zu erörternden Metallsalzen geben ausser Imprägnationen in einigen Fällen eine echte Tinktion (§ 364); umgekehrt liefern etliche der früher behandelten Farbstoffe ausser einer Tinktion eine echte Imprägnation. So giebt z. B. Methylenblau in ein und demselben Präparate beides, und ebenso zeigt die kritische Durchmusterung von guten Goldpräparaten, dass die Farbe an manchen Stellen ein feines solides Präzipitat, an anderen wieder eine völlig durchsichtige Tinktion ist.

351. Negative und positive Imprägnationen. Bei einer negativen Imprägnation sind lediglich die Intercellularsubstanzen gefärbt, die Zellen hingegen gar nicht oder nur schwach; bei einer positiven ist das Umgekehrte der Fall. Man nimmt dabei an, die negative sei primär, da sie direkt durch die Reduktion des Metalles in den Intercellularräumen bewirkt werde; die positive sekundär (wenigstens beim Silber), denn sie komme dadurch zu Stande, dass sich der metallische Niederschlag einer primären Imprägnation in den Gewebsäften wieder löse, und nun diese neue Metalllösung die Zellen färbe. Die sekundäre greife Platz, wenn die Reduktion des Metalls bei der primären nicht kräftig genug sei (s. His in: *Schweizer Zeit. Heilk. 2. Bd. 1862 p. 1; Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 393).

352. Wirkung des Lichtes auf die Lösungen von Metallsalzen. Man hält die Lösungen von Metallsalzen gewöhnlich im Dunkeln oder wenigstens in farbigen Flaschen, da man glaubt, dass das Licht sie durch Reduktion des Metalls verderbe. Oben p. 25 ist aber bereits gezeigt worden, dass wenigstens die Osmiumsäure nicht durch das Licht, sondern den Staub reduzirt wird, sodass man sie unbeschadet jenem aussetzen kann, wenn nur diesem absolut der Zugang verwehrt wird. Dasselbe scheint von den anderen Metallsalzen zu gelten, und es entsteht sogar die Frage,

ob solche Lösungen nicht für die Imprägnirungen geradezu besser werden, wenn man sie dem Licht aussetzt.

Dr. Lindsay Johnson schreibt hierüber an Lee wie folgt: „Wie ich experimentell festgestellt habe, gilt als Regel ohne Ausnahme, dass alle Lösungen von salzsauren oder salpetersauren Metallsalzen sich in reinen, weissen, gut geschlossenen Flaschen am Sonnenlichte unbegrenzt lange halten und, so weit Osmium, Uranium, Gold, Silber und Platin in Betracht kommen, durch gute Besonnung wirklich besser werden oder reifen. Alle Photographen sagen mir, ihr Papier versilbere sich gleichmässiger bei Behandlung mit alter, gut besonnter Lösung von Höllenstein als mit frischer, im Dunkeln gehaltener; und ich möchte daher sogar glauben, dass dies einer der Gründe ist, warum Färbungen mit Gold so wenig zufrieden stellen.“ Auch Apáthy (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1897 p. 722) lässt seine Goldlösung am Licht stehen, so lange kein Objekt darin ist.

353. Beschaffenheit der Gewebe. Während bekanntlich die meisten Tinktionen nicht an frischen, sondern an konservirten, d. h. mit Metallsalzen beladenen oder sonst veränderten Geweben ausgeführt werden, imprägniren sich die ganz frischen, d. h. solche, die noch leben oder wenigstens mit keinem Reagens behandelt worden sind, im Allgemeinen am leichtesten und besten. Ja, die meisten Imprägnationen gerathen überhaupt nicht mit Geweben, die nicht in dem angegebenen Sinne frisch sind.

Silber.

354. Allgemeines über Silbernitrat (Höllenstein). Von allen Silbersalzen wird dieses am meisten angewandt. Wir folgen hier den Auseinandersetzungen von Ranvier (Traité 1. Ed. p. 105).

Der Höllenstein wird entweder in Lösung oder fest angewandt. Fest braucht man ihn mit Vortheil für Cornea und fibröses Gewebe. Man nimmt das Auge heraus, fährt rasch mit einem Stück Höllenstein über die Cornea, trennt sie los, legt sie in Wasser, reibt mit einem Pinsel das Epithel ab und setzt sie dem Lichte aus; später zeigt sich, dass sich in der Flüssigkeit auf der Cornea etwas Höllenstein gelöst hat, durch das Epithel hindurch in das Fasergewebe gedrungen ist und sich auf diesem durch das Licht reduzirt hat, während die Zellen ungefärbt geblieben sind. — Die Lösung macht man 1 % stark, verdünnt sie aber je nachdem mit dem 2—4fachen Volumen Wasser; ihre Anwendung variirt je nach den Umständen in den Einzelheiten, und dies ist sehr wichtig. Eine Membran z. B. muss man ausspannen und zuerst mit destillirtem Wasser abwaschen, um die Albuminate und das Blut zu entfernen, darauf mit der Höllenstein-Lösung behandeln, und zwar

in direktem Sonnenlicht oder wenigstens bei grosser Helle, sonst kommt es zu keiner starken Färbung. Sobald nun die Membran weiss geworden ist und gerade schwärzlich-grau zu werden anfängt, wäscht man sie wieder mit Wasser ab und untersucht sie in einem passenden Medium. Nimmt man die Lösung zu schwach ($^1/_{500}$ bis $^1/_{1000}$), oder ist das Licht nicht kräftig genug, so resultirt eine allgemeine Färbung anstatt der interstitiellen: am stärksten sind dann die Kerne gefärbt, weniger das Plasma, noch weniger die Intercellularsubstanz. Im Allgemeinen treten bei einer guten Imprägnation die Zellen, besonders die Kerne, gar nicht hervor.

Ranvier macht ferner darauf aufmerksam, dass man die Gewebe beim Imprägniren im Silberbade immer bewegen müsse, sonst würden sich darauf Präzipitate bilden und könnten zu Täuschungen führen. Nach der Imprägnation kann man mit Pikrokarmin (oder einem anderen Karmingemisch) die Kerne färben, falls jene nicht zu weit gegangen ist.

Zum Spannen der Membranen verwendet man mit Vortheil die **Ringe von Hoggan.** Es sind ein Paar Ringe aus Hartgummi, die genau in einander passen, sodass man Membranen zwischen sie klemmen und ausspannen kann (s. Journ. R. Micr. Soc. London Vol. 2 1879 p. 357; Journ. Anat. Phys. Paris 15. Année 1879 p. 54). Neuerdings hat sie Eternod wieder erfunden (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1897 p. 39); zu haben sind sie nach ihm in Genf bei Demaurex (Bandagiste, Fusterie).

355. Die gebräuchlichsten Lösungen des Höllensteins. Ranvier gebraucht den Höllenstein meist in Lösungen von 1 : 300 (Epiploon, Lungenepithel, Knorpel, Sehne) bis 1 : 500 (Vaguscentrum, Darmepithel). Zur Injektion in Blutgefässe, um das Endothel zu imprägniren, nimmt er 1 : 500 bis 1 : 800. — Duval (Précis p. 229) verwendet Lösungen von 1 bis höchstens 3 %, Recklinghausen (* Lymphgefässe 1862 Berlin p. 5) für die Cornea 1 : 400 bis 500. — Robinski (Arch. Phys. Paris Tome 2 1869 p. 452) lässt Lösungen von 1 : 500 bis 1000 eine halbe Minute lang einwirken, — Reich (Sitzungsb. Akad. Wien 67. Bd. 3. Abth. 1873 p. 83) injizirt die Gefässe, um das Endothel zu untersuchen, mit 1 : 400 bis 600. — Rouget (Arch. Phys. Paris Tome 5 1873 p. 38) badet die Gewebe in 1 : 750 bis 1000 mehrere Male nur je 3—5 Sekunden lang und wäscht sie dazwischen jedesmal mit Wasser ab. — Die Hertwigs (Jena. Zeit. Naturw. 14. Bd. 1880 p. 324) verwenden für Seethiere 1 : 100, die Hoggans (Journ. Anat. Phys. London Vol. 15 1881 p. 477) für die Lymphgefässe dieselbe Stärke. — Tourneux & Herrmann (Journ. Anat. Phys. Paris 12. Année 1876

p. 200) lassen die Epithelien von Wirbellosen in 3 : 1000 und noch schwächeren Lösungen 1 Stunde lang und bringen sie dann gleich in Alkohol von 90 %.

Hoyer (Arch. Mikr. Anat. 12. Bd. 1876 p. 649) setzt zu einer Silberlösung von bekannter Stärke so viel Ammoniak, bis der Niederschlag sich gerade wieder löst, und verdünnt dann die Lösung, bis sie nur noch $^3/_4$—$^1/_2$ % Höllenstein enthält. Dieses Doppelsalz dient ihm hauptsächlich zur Injektion der Gefässe (wegen des Endothels), aber auch zur Imprägnation von Membranen durch einfaches Darübergiessen. Es imprägnirt ausschliesslich das Endothel oder Epithel, nicht auch das Bindegewebe, soll auch die Färbung schärfer machen als die gewöhnlichen Lösungen.

Dekhuizen (Anat. Anzeiger 4. Jahrg. 1889 p. 790) wäscht (ähnlich wie Harmer, s. § 359) das Mesenterium des Frosches erst mit einer isotonischen Lösung von Salpeter (13 : 1000), bringt es dann auf 3—6 Minuten in eine $^1/_4$ %ige Lösung von Höllenstein, die 3 % Salpetersäure enthält, darauf in diese 3%ige Säure, von hier durch Alkohol von 96 % in Nelkenöl, wo sich das Silber bei diffusem Lichte in einigen Minuten reduzirt. Die Gewebe sollen ausgezeichnet konservirt sein, und die Kerne sich mit Hämateïnthonerde, Safranin oder Methylgrün nachfärben lassen. — Regaud (Journ. Anat. Phys. Paris 30. Année 1894 p. 719; Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 74) behandelt nach Renaut die Lymphgefässe mit einem Gemisch der Lösungen von Höllenstein, Pikrinsäure, Osmiumsäure und Essigsäure.

Bergh (Anat. Hefte 1. Abth. 14. Bd. 1900 p. 392) verwendet für Anneliden entweder ein Gemisch gleicher Theile 1%iger Silbernitratlösung und 1 %iger Salpetersäure oder das Gemisch von Fischel (1%ige Lösung von Höllenstein 2 Th., Ameisensäure 1 Th., destill. Wasser 1 Th.).

356. Andere Silbersalze. Alferow (Arch. Phys. Paris (2) Tome 1 1874 p. 694; Duval, Précis p. 230) hat mit Silberpikrat, -laktat, -acetat und -citrat bessere Resultate erhalten als mit Höllenstein. Er verwendet die Salze in einer Lösung von 1 : 800, die mit etwas von der betreffenden Säure versetzt ist (auf 800 ccm 10—15 Tropfen der konzentrirten Säurelösung), damit sich keine Niederschläge von Silber mit den Chloriden, Karbonaten etc. in den Geweben bilden.

357. Reduktion des Höllensteins. Sie lässt sich auch in anderen Medien als nur in destillirtem Wasser bewirken.

Recklinghausen (Arch. Path. Anat. 19. Bd. 1860 p. 451) bringt die Präparate in schwaches Salzwasser, bevor er sie dem Licht aussetzt. — Müller (ibid. 41. Bd. 1867 p. 120) imprägnirt sie 2—3 Minuten lang im Dunkeln mit einer 1 %igen Lösung von Höllenstein, setzt dann ein wenig von einer 1 %igen Lösung von Jodsilber (in Jodkalium und Wasser) hinzu, bewegt die Präparate darin hin und her, wäscht sie mit destill. Wasser ab und lässt sie wenigstens 2 Tage lang am Lichte in $^1/_{10}$ %igem Höllenstein stehen.

Rouget (Arch. Phys. Paris Tome 5 1873 p. 38) reduzirt in Glycerin oder in einem Gemisch von diesem und Alkohol, Sattler (Arch. Mikr. Anat. 21. Bd. 1882 p. 672) in Wasser mit etwas Essigsäure oder Ameisensäure, Thanhoffer (*Mikroskop, 1880), in einer Essigsäure von 2 %.

Krauss bringt die Präparate nach dem Abwaschen in eine hellrothe Lösung von Kaliumhypermanganat; sie reduziren das Silber darin sehr rasch, selbst im Dunkeln, indessen nicht immer; Oppitz lässt 2—3 Minuten lang eine $^1/_4$—$^1/_2$ %ige Lösung von Zinnchlorid auf sie einwirken, und dann geht die Reduktion rasch vor sich (s. Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 400).

Jakimovitch (Journ. Anat. Phys. Paris 24. Année 1888 p. 150) überträgt die im Dunkeln versilberten Nerven, sobald sie in Wasser am Licht dunkelbraun geworden sind, auf 2—3 Tage in das Gemisch von Pritchard (100 Wasser, 1 Amylalkohol und 1 Ameisensäure). Sie werden darin am Licht anfänglich heller, weil etwas Silber gelöst wird, daher muss auch die Flüssigkeit ab und zu erneuert werden. Hat sich alles Silber gelöst, so bleibt in den Nerven eine dunklere Färbung zurück. Nervenzellen versilbert J. 2 Tage lang und lässt sie dann 5—7 Tage in dem Säuregemisch.

S. auch oben p. 230 die Methode von Dekhuizen.

Gerota (Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. 1897 p. 433) wäscht das Gewebe erst gut mit destill. Wasser aus und bringt es dann in eine Lösung von Hydrochinon (mit Natriumsulfit etc.) und von da zur Fixirung in eine Lösung von Natriumhyposulfit.

358. Nachdunkeln. Legros (*Journ. Anat. Phys. Paris 4. Année 1868 p. 275) wäscht die Präparate nach der Reduktion mit Natriumsulfit, um das Nachdunkeln zu verhüten. Nach Duval (Précis p. 230) dürfen sie in einer 2 %igen Lösung nur wenige Sekunden bleiben und kommen dann in destillirtes Wasser. — S. auch oben Gerota.

359. Höllenstein bei Seethieren. Wegen der vielen Chloride in ihren Geweben können die Seethiere nicht direkt mit Höllenstein behandelt werden. Hertwig (Jena. Zeit. Naturw. 14. Bd. 1880 p. 324) fixirt sie daher erst mit etwas Osmiumsäure, wäscht sie dann mit destillirtem Wasser so lange, bis dieses mit Höllenstein nur noch ein unbedeutendes Präzipitat gibt, und behandelt sie erst dann 6 Minuten mit 1 %igem Höllenstein. — Harmer (Mitth. Z. Stat. Neapel 5. Bd. 1884

p. 445) wäscht sie in einer 5 % igen Lösung von Salpeter und behandelt sie dann wie gewöhnlich mit Höllenstein. Diese Methode ist gut für allerlei kleine Seethiere (Bryozoen, Medusen, Hydroiden, *Sagitta*, *Appendicularia*), auch für Schwämme, Anneliden, Fischeier. Eine $4\frac{1}{2}$ % ige Lösung von Natriumsulfat kann mitunter an die Stelle des Salpeters treten. (S. auch oben p. 230 die Methode von DEKHUIZEN.)

360. Imprägnation des Nervensystems. Hierüber, besonders über die Methode von Golgi, s. Kapitel 29.

361. Doppelfärbung der Objekte nach der Versilberung. Die Kerne lassen sich wie gewöhnlich färben, nur dürfen die Färbgemische kein freies Ammoniak enthalten, da sonst das Silber sich wieder löst. Auch sind dazu nur negative Imprägnationen verwendbar, denn falls die Kerne selber Silber enthalten, so nehmen sie keine Farbe mehr an.

Auch Gold lässt sich nach Silber imprägniren, setzt sich jedoch einfach an dessen Stelle und liefert mithin keine eigentliche Doppelfärbung (s. § 363).

362. Art des metallischen Niederschlages. Es besteht noch grosse Unklarheit über die Natur des Niederschlages, den das Silbersalz bei primärer Imprägnirung in den Intercellularräumen hervorbringt. Nach RECKLINGHAUSEN bildet es nämlich mit der hypothetischen Kittsubstanz eine Verbindung, die am Licht schwarz wird; Andere halten die farbigen Linien entweder für die gefärbten Zellmembranen oder lassen sich das Metallsalz mit der Flüssigkeit um die Zellen verbinden und so in den Furchen zwischen den Zellen niederschlagen. SCHWALBE (Arch. Mikr. Anat. 6. Bd. 1870 p. 24) möchte zwei Fälle unterscheiden: die Bildung der oberflächlichen schwarzen Netze beruht wahrscheinlich auf einem echten Niederschlage, d. h. dem in den Intercellularräumen reduzirten Metall; die braune Färbung der Kittsubstanz in den tieferen Schichten tritt erst viel später ein und beruht wohl auf der Bildung einer sich durch die längere Wirkung des Lichtes bräunenden Verbindung des Metalls mit der Kittsubstanz. — RABL (Sitzungsb. Akad. Wien 102. Bd. 3. Abth. 1893 p. 349; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 42) zeigt, dass der Niederschlag bestimmt nicht aus metallischem Silber besteht, da er sich in Natriumhyposulfit löst, wohl aber ein Albuminnitrat oder ein Oxyd des Silbers sein mag.

Gold.

363. Imprägnation mit Gold. Das Goldchlorid gibt im Gegensatz zum Höllenstein nur positive Imprägnationen (§ 351); negative gibt es wohl nur, wenn man es an die Stelle des in den Geweben schon negativ niedergeschlagenen Silbers treten lässt. Zu diesem Zwecke imprägnirt

man die Objekte erst sehr leicht mit Höllenstein, reduzirt diesen, lässt dann einige Minuten lang eine $^1/_2{}^0/_0$ige Lösung von Goldchlorid einwirken und reduzirt nochmals in angesäuertem Wasser.

Diese Methode ist indessen nur wenig gebräuchlich, und wenn man von der Färbung des Zellplasmas (bei Studien über die Zelle), der Cornea und des Bindegewebes absieht, so dient das Goldchlorid bisher fast nur zur Imprägnirung des Nervengewebes. Dafür aber zeigt es eine bemerkenswerthe Elektivität und wird daher mit Recht als ein äusserst werthvolles Mittel zum Studium der Nervenendorgane und des Verlaufes der Nerven geschätzt. Aber nicht jede Vergoldung gelingt; ja, man darf nicht übersehen, dass nur sehr wenige gelingen. Ferner verdienen auch die besten Vergoldungen nur so weit Glauben, wie sie etwas zeigen, liefern dagegen gar keinen Beweis dafür, dass Dinge, die sie nicht zeigen, auch nicht existiren, denn man weiss nie sicher, ob die Imbibition des Goldsalzes nicht in launischer Weise fehlgeschlagen ist, oder die Reduktion an irgend einem Punkte launisch Halt gemacht hat.

364. Tinktion mit Gold. Nach den neueren Untersuchungen von Apáthy (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1897 p. 718) gibt die Vorvergoldung, d. h. die Vergoldung frischer Gewebe, die entgegengesetzten Resultate von der Nachvergoldung, d. h. der Vergoldung nach dem Fixiren. Bei jener nämlich bleiben in den Zellen die Kerne fast farblos, während das Plasma sich ziemlich stark färbt; in den Muskeln sind die Primitivfibrillen sehr blass bis farblos, und die Nerven werden (mit Ausnahme der Myelinscheiden) dunkel roth-violett, sodass der Achsencylinder nur als Ganzes deutlich hervortritt. Dagegen liefert die Nachvergoldung der bereits fixirten Gewebe eine scharfe Kernfärbung, während das Plasma blasser wird; in den Muskeln sind die Primitivfibrillen lebhaft kirschroth, die Neurofibrillen dagegen intensiv schwarz und von der Interfibrillärsubstanz scharf unterschieden.

Beide Arten der Vergoldung dürfen keine Imprägnation, sondern müssen eine reine Tinktion (von Hellrosa bis Dunkelviolett, je nach dem Gewebe) bewirken; nur in den Myelinscheiden lagert sich unter Umständen das Gold in Körnchen ab. Die Tinktion scheint darauf zu beruhen, dass sich aus dem Goldchlorid zunächst Goldoxyd (Au O) bildet und sich entweder als solches oder als Metall mit den Geweben verbindet. Damit das geschehen könne, muss das Licht das Gewebe von beiden Seiten her vollkommen und möglichst un-

geschwächt durchdringen. Dabei ist es zwar einerlei, von welchen Thieren die Objekte stammen, aber sie dürfen nur so dünn sein, dass das Licht wirklich gut hindurch strahlen kann, müssen mithin entweder Membranen u. dgl. oder Schnitte sein. Von der Lösung des Goldsalzes (§ 365) muss man etwa 10 mal so viel nehmen, wie das Volumen des Objektes beträgt, und sie ist noch so lange gut, wie sie ihre Farbe beibehält; da sie die Gewebe etwas kontrahirt (frische sogar stark), so müssen die Objekte vorher festgesteckt, ausgespannt oder sonst wie befestigt sein, jedoch stets so, dass das Licht ungehindert hindurch kann. Nach dem Goldbade werden sie in verdünnte Ameisensäure (1 Theil der Säure von 1,223 spez. Gew. auf 100 Theilen destill. Wasser) gebracht und dürfen darin nur möglichst wenig bewegt werden, damit der purpurne Farbstoff (Goldoxyd?), der sich aus dem Goldchlorid durch das Licht bildet, nicht aus den Geweben herausgeschwemmt werde; auch müssen sie im sauren Wasser so aufgestellt werden, dass das Licht von allen Seiten hinzu kann. Die Belichtung sei so kräftig wie möglich, jedoch dürfen die Objekte dadurch höchstens 20 ° C. warm werden (im Winter bei 10—15 ° C. direkte Sonne, im Sommer diffuses Tageslicht); sie daure im Winter mindestens 8, im Sommer mindestens 6 Stunden, stets aber ununterbrochen, und nur gelegentlich im Winter mehr als 24 Stunden.

Beiderlei Vergoldungen sind absolut dauerhaft; nur freies Chlor, Brom oder Jod bleichen sie, sonst aber darf man die Präparate maceriren, färben und einschliessen, wie man will.

365. Käufliche Goldsalze. Nach Squire (Methods p. 43) ist in England das Goldchlorid des Handels nicht das reine Chlorid, $AuCl_3$, sondern das kristallisirte Doppelsalz Goldchloridnatrium mit ungefähr 50 % metallischem Gold. Das Goldchloridnatrium aber des Handels ist obiges Doppelsalz mit dem gleichen Gewicht Kochsalz gemischt, enthält also etwa 25 % Gold.

In Deutschland hingegen enthält nach Grübler & Hollborn (laut brieflicher Mittheilung an Mayer) das Aurum chloratum fuscum etwa 53 %, das flavum nur 48 % Gold; in beiden darf ausser dem Goldchlorid nur Wasser und Salzsäure, aber kein Kochsalz vorhanden sein, und dies gilt von den Grüblerschen Präparaten. Das reine Auronatr. chlor. enthält 14,7 % Kochsalz, im Handel giebt es aber auch Sorten mit viel mehr davon.

Apáthy (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1897 p. 722) hat früher das Aurum chloratum flavum des Handels ($AuCl_4H + 4H_2O$?) benutzt, zieht aber jetzt das fuscum ($AuCl_3 + 2H_2O$ oder ganz wasserfrei?) vor. Beide Präparate stammen von Merck in Darmstadt.

A. Vorvergoldung.

366. Beschaffenheit der Gewebe. Während man allgemein nur ganz frische Gewebe der Vergoldung unterzieht, liefern nach Drasch (Sitzungsb. Akad. Wien 82. Bd. 3. Abth. 1881 p. 171, 88. Bd. 3. Abth. 1884 p. 534; *Abh. Math. Phys. Kl. Sächs. Ges. Wiss. 14. Bd. 1887; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 492) solche, die nach dem Tode 12—48 Stunden an einem kühlen Orte gelegen haben, bessere Resultate; D. glaubt denn auch, die organischen Säuren in der Methode von Löwit u. A. haben vielleicht nur die Gewebe etwa in denselben Zustand zu versetzen, worin man sie eine gewisse Zeit nach dem Tode von selbst finde, d. h. wo die Nerven besonders für die Imprägnation mit Gold empfänglich seien.

367. Goldchlorid und Essigsäure. Cohnheim (Arch. Path. Anat. 38. Bd. 1867 p. 348; Strickers Handb. Gew. p. 1100) legt das frische Gewebe in eine $^1/_2$ %ige Lösung von Goldchlorid, bis es ordentlich gelb geworden ist, und setzt es dann in Wasser mit etwas Essigsäure so lange dem Lichte aus, bis das Gold gut reduzirt ist, was spätestens in einigen Tagen geschieht. Dann bringt er das Präparat in angesäuertes Glycerin.

Diese Methode gibt trotz ihrer primitiven Form oft sehr gute Resultate, färbt manchmal aber die Kerne oder das Plasma, zuweilen auch die Intercellularsubstanz ähnlich wie Silber. Auch ist die Vergoldung alles andere eher als dauerhaft.

368. Goldchlorid und Ameisensäure. Löwit (Sitzungsb. Akad. Wien 71. Bd. 3. Abth. 1875 p. 372) bringt die Gewebe, um das Gold leichter eindringen und sich reduziren zu lassen, durch Ameisensäure von 1,12 sp. Gew. zum Quellen, legt sie dann auf einige Minuten in das Goldchlorid (1—1 $^1/_2$ %ige wässerige Lösung) und zuletzt auf 24 Stunden wieder in Ameisensäure, aber dieses Mal in verdünnte (1 Theil auf 1—3 Theile Wasser) und im Dunkeln. — Aehnlich verfährt Fischer (Arch. Mikr. Anat. 12. Bd. 1875 p. 366). — Kühne (*Zeit. Biol. 23. Bd. 1887; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 495) reduzirt in 50 %igem Glycerin mit $^1/_4$—$^1/_5$ Volumtheil Ameisensäure.

369. Goldchlorid mit Ameisensäure. RANVIER (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 20 1880 p. 456) gibt, da die Ameisensäure zu Anfang den Endzweigen der Nerven schade, ihr als Antagonisten ein Fixirmittel an die Seite und bringt daher die Gewebe in ein Gemisch von 4 Theilen des 1%igen Goldchlorids und 1 Theil Ameisensäure, das aufgekocht und wieder kalt geworden ist (RANVIER, Traité 1. Ed. p. 826). Darin bleiben sie bis zur völligen Durchtränkung (Muskeln 20 Minuten, Epidermis 2—4 Stunden), und dann lässt man sich das Gold entweder am Licht in angesäuertem Wasser, oder im Dunkeln in verdünnter Ameisensäure (1 Theil auf 4 Theile Wasser) reduziren.

Gekocht soll das Gemisch des Goldchlorids und der Säure werden, weil dadurch das Gold mehr zur Reduktion neige, und daher seine elektive Wirkung auf die Nerven verstärkt werde.

370. Goldchlorid und Citronensaft. Nach RANVIER (Traité 1. Ed. p. 813) ist von allen Säuren der Citronensaft am unschädlichsten für die Nervenenden. Man legt die Gewebe in frischen Saft, der durch Flanell filtrirt worden ist, bis sie durchsichtig werden (Muskeln in 5—10 Minuten), wäscht sie rasch in Wasser, bringt sie auf 20 Minuten in Goldchlorid (1%), wäscht sie wieder und gibt sie in ein Glas mit 50 ccm destill. Wasser und 2 Tropfen Essigsäure. Hierin setzt man sie dem Licht aus; die Reduktion vollzieht sich in 24—48 Stunden. Die Präparate eignen sich aber nur zum sofortigen Studium, später dunkeln sie in Folge weiterer Reduktion stark nach. Will man sie hingegen dauerhaft haben, so muss man die Reduktion im Dunkeln in nur einigen Kubikcentimetern verdünnter Ameisensäure (1 Theil Säure auf 4 Theile Wasser) geschehen lassen, und das dauert 24 Stunden.

371. Osmiumsäure und Goldchlorid. VIALLANES (Ann. Sc. N. (6) Tome 14 1883 p. 42) behandelt die Gewebe mit 1%iger Osmiumsäure, bis sie eben braun werden, dann mit 25%iger Ameisensäure 10 Minuten lang; darauf kommen sie in Goldchlorid 1 : 5000 (oder noch viel schwächer) 24 Stunden lang im Dunkeln und werden zuletzt im Licht in 25%iger Ameisensäure reduzirt. Nach meinen (LEE) Erfahrungen ist die Methode ausgezeichnet und wahrscheinlich auch in manchen anderen Fällen vortheilhaft.

372. Andere ältere Methoden. Die vielen anderen Methoden weichen von den aufgeführten hauptsächlich in der Art ab, wie man die Reduktion zu erleichtern und so vollständig wie möglich zu machen bestrebt war. So modifizirt BASTIAN (Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 402) die Methode von Cohnheim, indem er das Goldchlorid in einer Lösung von 1 : 2000 nimmt (dazu auf je 75 ccm 1 Tropfen

Salzsäure) und die Reduktion sich in einem Gemisch gleicher Theile von Alkohol und Ameisensäure warm vollziehen lässt. — Hénocque (*Arch. Phys. Paris 3. Année 1870 p. 397) imprägnirt mit $^1/_2$%igem Goldchlorid, wäscht 12—24 Stunden in Wasser und reduzirt warm (bei 40—50°) in einer gut verschlossenen Flasche mit fast gesättigter Lösung von Weinsteinsäure. Die Reduktion ist oft schon in $^1/_4$ Stunde beendet. Diese Methode ist übrigens als die von Chrschtschonowitsch beschrieben worden (Arch. Mikr. Anat. 7. Bd. 1872 p. 383).

Hoyer (ibid. 9. Bd. 1873 p. 222) verwendet für die Nerven der Cornea eine $^1/_2$%ige Lösung von Goldchloridkalium; dieses sei besser als das einfache Goldchlorid, da es leichter konstant zu bekommen, eher neutral und in der $^1/_2$%igen Lösung haltbarer sei. Die Cornea nun wird mit der Lösung ganz sorgfältig durchtränkt: die vom Kaninchen oder Meerschweinchen $^1/_2$—1 Stunde, die vom Menschen (in angesäuerter Lösung) 2—5 Stunden lang, aber lieber zu lange als zu kurz. Um die intraepithelialen Nervenzweige zu zeigen, wird das Gold nur theilweise (bis die Präparate schwach graublau werden) reduzirt, indem man die Cornea auf 16—24 Stunden in 30—60 ccm destill. Wasser mit 1 — 2 Tropfen eines Pyrogallol-Entwicklers (s. Gerlach, Die Photographie als Hülfsmittel der mikr. Forschung, Leipzig 1863) legt. Oder man belässt sie im Brütofen in einer konzentrirten Lösung von Weinsteinsäure bis zur völligen Reduktion.

Ciaccio (Arch. Ital. Biol. Tome 3 1883 p. 75; Journ. Micr. Paris Tome 7 1883 p. 38) verwendet Goldchloridcadmium in 1%iger Lösung.

Flechsig (1876; auch in: Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1884 p. 453) reduzirt in 10%iger Natronlauge. — Nesteroffski (Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 404) behandelt die Präparate nach der Imprägnation mit Schwefelammonium und beendet die Reduktion in Glycerin. — Böhm (s. Carrière in: Arch. Mikr. Anat. 21. Bd. 1882 p. 146) reduzirt in Pritchards Gemisch (1 Amylalkohol, 1 Ameisensäure, 98 Wasser).

Manfredi (s. Marchi in: *Arch. Ophth. 28. Jahrg. Abth. 1 1882 p. 205) legt die frischen Muskeln auf $^1/_2$ Stunde in 1%iges Goldchlorid, dann in $^1/_2$%ige Oxalsäure, die auf 36° C. erwärmt worden ist, lässt sie darin abkühlen, untersucht sie und hebt sie in Glycerin auf. Sonniges warmes Wetter ist dabei nöthig. — Boccardi (*Lavori Istit. Fisiol. Napoli Fasc. 1. 1886 p. 27; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887

p. 492) legt zur Reduktion die Gewebe im Dunkeln auf 2—4 Stunden in schwache Lösung von Oxalsäure (1 : 1000 bis 3 : 1000) oder in ein Gemisch von 5 ccm Ameisensäure, 1 ccm 1 %iger Oxalsäure und 25 ccm Wasser.

Kolossow (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 52) imprägnirt 2 bis 3 Stunden lang mit 1 %igem Goldchlorid, das mit 1 % Salzsäure vermischt ist, und reduzirt 2—3 Tage lang im Dunkeln in Chromsäure von 1 : 10000 bis 1 : 5000.

Die Vergoldung von entkalkten Zähnen s. bei Underwood (*Journ. Brit. Dental Ass. Vol. 11 1890 p. 696; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1890 p. 815). — Nach Geberg (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 10. Bd. 1893 p. 231) erleichtert die Behandlung der Gewebe mit Kalkwasser (Methode von Arnstein) 24 Stunden lang die Reduktion sehr. — Bernheim (Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1892 Suppl. p. 19; Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 484) fügt zu 10 ccm von Löwits verdünnter Ameisensäure ein Körnchen frischen schwefligsauren Natriums ($NaHSO_3$).

Ueber Vergoldung durch Kochen s. unten § 540 (Sandmann).

373. Vorvergoldung nach Apáthy (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1897 p. 728). Das frische Objekt kommt im Dunkeln in eine 1 %ige Lösung von Aur. chlor. flavum (§ 365) auf mindestens 2 Stunden, sehr dünne Membranen länger, bis über Nacht, dann direkt auf 24 Stunden in 1 %ige Ameisensäure und wird nun in ihr 6—8 Stunden lang ununterbrochen allseitig belichtet. Nach der 1. Stunde kann man die etwa dunkel gewordene Säure wechseln, bewege aber dabei das Objekt möglichst wenig. Nachher direkter Einschluss in konz. Glycerin oder in Gummisyrup (§ 416).

Auch schon einige Zeit todte oder in Ranviers Drittelalkohol macerirte Objekte (z. B. die elektrischen Platten von *Torpedo*) liefern noch gute Präparate. — Eine etwas andere Methode der Vorvergoldung hat Apáthy (Mikrotechnik p. 173) früher angegeben.

B. Nachvergoldung.

374. Goldchloridkalium. Gerlach (Strickers Handbuch d. Gewebelehre p. 678) härtet kleine Stücke Rückenmark 15—20 Tage lang in 1—2 %iger Lösung von Ammoniumbichromat und bringt die Schnitte auf 10—12 Stunden in eine mit Salzsäure ganz schwach angesäuerte Lösung von Goldchloridkalium (1 : 10000 Wasser), wäscht sie erst in

schwacher Salzsäure (1:2000 bis 3000), dann in schwach saurem (1 : 1000) 60 %igem Alkohol und bringt sie durch Nelkenöl in Balsam. (Oder er schneidet mit dem Rasirmesser dünne Schnitte durch frisches Rückenmark, legt sie auf 2—3 Tage in Ammoniumbichromat (1:5000 bis 10000), dann auf 24 Stunden in ganz schwaches Ammoniakkarmin, zerzupft sie und schliesst die isolirten Nervenzellen entweder in Glycerin oder nach dem Austrocknen in Balsam ein.)

Golgi (Mem. Accad. Torino (2) Tomo 32 1880 p. 382) bringt die in 2 %iger Lösung von Kaliumbichromat gehärteten Gewebe zunächst auf 10—20 Minuten in eine 1 %ige Lösung von Arsensäure, bis sie durchsichtig werden, dann auf 20—30 Minuten in 1/2 %iges Goldchloridkalium, wäscht sie mit Wasser und reduzirt sie an der Sonne 24—30 Stunden lang in einer 1 %igen Lösung von Arsensäure, die er, sobald sie braun wird, wechselt. Einschluss ebenfalls in Glycerin. — Kühne (*Zeit. Biol. 23. Bd. 1887; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 495) legt die Muskeln statt in das reine Goldsalz in ein Gemisch von Goldchloridkalium 1/4 % und Osmiumsäure 1/10 %.

Upson (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1891 p. 474) gibt zwei äusserst komplizirte Methoden zur Vergoldung von Schnitten an. Bei der einen verwendet er Eisenchlorid, bei der anderen Ammoniumvanadat.

375. Nachvergoldung der Neurofibrillen. Nach Apáthy (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1897 p. 729) werden die Gewebe von Wirbellosen in Sublimat (konzentrirter Lösung in 1/2 %igem Salzwasser) oder Sublimatalkohol (oben § 62d) höchstens 12 Stunden lang fixirt, die von Wirbelthieren hingegen (nur 1 mm dicke Stücke!) in einem Gemische leicher Theile Sublimat (in 1/2 %igem Salzwasser) und 1 %iger Osmiumsäure, das aber erst vor dem Gebrauch hergestellt wird. (Damit die Osmiumsäure nicht zu stark schwärze, müssen alle Operationen mit den Objekten bis zum Einbetten in Paraffin bei sorgfältigem Abschluss des Lichtes geschehen.) Dann werden sie mit wässeriger Lösung von Jodkalium 6—8 Stunden lang ausgewaschen, in 95 %igen Alkohol bis über Nacht gelegt, nochmals mit Jodjodkalium (1/2 % J und 1 % KJ in Alkohol) behandelt und entweder (durch Chloroform oder Chloroform 4 Theile und Aether 1 Theil, nicht durch Xylol) in Paraffin oder in Celloidin eingebettet. Die aufgeklebten Paraffinschnitte bringt man durch Chloroform etc., die Celloidinschnitte durch Bergamottöl etc. (§ 199) auf 2—6 Stunden in destillirtes Wasser (oder nach dem Abspülen mit Wasser auf 1 Minute in 1 %ige Ameisensäure und nach

nochmaligem Abspülen in das Goldbad), dann auf 24 Stunden, mindestens über Nacht, in das 1 % ige Goldbad (§ 373), taucht sie kurz in destillirtes Wasser, oder wischt die Goldlösung mit Filtrirpapier vom Objektträger ab, und stellt nun jeden Objektträger für sich in einen Tubus voll 1 % iger Ameisensäure schräg so auf, dass die Schnitte (am besten von 7—10 μ) nach unten schauen, damit sich nicht etwa Gold auf ihnen niederschlagen kann. Nach der Belichtung Färben (der Kerne etc.) und Einschliessen beliebig.

Nach meinen (Lee) Erfahrungen kann man vortheilhaft in einer schwachen Lösung von Formaldehyd (mit oder ohne Ameisensäure) reduziren.

Es ist durchaus nöthig, alle Operationen bis zum Einbetten möglichst rasch zu machen. In Paraffin halten sich die zu vergoldenden Objekte unbegrenzt lange, in Celloidin jedoch nur dann, wenn man den Block in Glyceringelatine aufhebt, auf die man etwas Thymol (gegen den Schimmel) legt; will man dann schneiden, so erwärmt man die Gelatine gelinde, nimmt den Block heraus, wäscht ihn mit lauem Wasser ab und schneidet ihn sofort, wobei man das Messer mit 90 % igem Alkohol benetzt hält.

376. Konserviren der vergoldeten Präparate. Zum Einschluss der Präparate dient entweder Balsam, angesäuertes Glycerin (1 % Ameisensäure) oder Zuckersyrup (§ 416). Eigentlich sollten sie, wenn die Reduktion vollendet war, sich immer gut halten, in Wirklichkeit werden sie nachträglich oft schwarz. Dies lässt sich nach Ranvier dadurch vermeiden, dass man sie einige Tage lang in Alkohol legt, indessen ist offenbar auch hierdurch ihre Dauer nur etwas länger, nicht für immer garantirt. Die zu schwarz gewordenen kann man mit Cyankalium (½ % nach Cybulski) oder rothem Blutlaugensalz (schwache Lösung nach Redding) bleichen, ohne dass aber das Resultat besonders befriedigte.

Andere Metalle.

377. Osmiumsäure und Pyrogallussäure oder Holzessig. Lee (La Cellule Tome 4 1887 p. 110) bringt die Gewebe aus der Osmiumsäure in eine schwache Lösung von Pyrogallussäure; hierin werden sie oft sehr gut grünlich schwarz, oft aber auch ganz unbrauchbar schwarz. Viel bessere Resultate ergibt die Pyrogallussäure in ihrer Anwendung auf die Methode von Hermann. Dieser (Arch. Mikr. Anat. 37. Bd. 1891 p. 570) nämlich fixirt die Gewebe 1 oder 2 Tage lang in seiner Platin-Essig-Osmiumsäure (§ 72), wäscht sie gründlich

mit Wasser und härtet sie in immer stärkerem Alkohol; endlich legt er sie zur Schwärzung 12—18 Stunden lang in rohen Holzessig, der aber so roh wie nur möglich, also recht braun sein und schlecht riechen muss (Anat. Hefte 2. Abth. 2. Bd. 1893 p. 28). Ich (Lee) nun fixire die Gewebe im Gemisch von Hermann oder von Flemming; zum besseren Fixiren mögen sie darin 12 oder 24 Stunden lang bleiben; handelt es sich aber bloss um die Färbung, so lässt man sie nur $^1/_2$ Stunde darin und bringt sie dann direkt in den Holzessig, besser aber noch in eine schwache Lösung von Pyrogallussäure; für kleine Objekte ist 1 Stunde mehr als genug, grössere bleiben bis zu 24 Stunden darin. (Man kann auch eine alkoholische Lösung nehmen, und zuweilen mag diese sogar noch besser sein als die wässerige.) Tannin hat sich an Material aus Flemmings Gemisch nicht bewährt.

Man erreicht auf diese Art sowohl eine gute Kern- als auch eine brauchbare Plasmafärbung; für das Chromatin hat man zwar keinen besonderen Farbstoff mehr nöthig, kann aber Safranin doch noch anwenden (24 Stunden färben, dann saurer und neutraler Alkohol). An Invertebraten wird das Nervengewebe mitunter sehr schön differenzirt. Auch ist die Methode sehr bequem und mit Pyrogallussäure sehr sicher (mit Holzessig nicht immer).

Uebrigens handelt es sich bei der Methode von Hermann keineswegs um eine Reduktion des Osmiums, sondern um eine Färbung durch Stoffe im rohen Holzessig. Denn H. hat dieselben Resultate an Material aus Sublimat oder Alkohol bekommen (Anat. Hefte 2. Abth. 1. Bd. 1892 p. 7).

Die Methode mit dem Holzessig wird auch wohl Mährenthal zugeschrieben. — Azoulays Modifikation derselben für markhaltige Nerven s. unten § 708, die von Heller & Gumpertz in: Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1896 p. 385. — S. auch Kolossow (ibid. 9. Bd. 1892 p. 38 und 1893 p. 316).

378. Osmiumsäure und Oxalsäure nach Brösike (Centralbl. Med. Wiss. 16. Jahrg. 1878 p. 833; Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 409). Man legt die Objekte aus der Osmiumsäure auf wenigstens 24 Stunden in eine wässerige Lösung von Oxalsäure (1 : 15) und erhält so eine rothe Färbung.

379. Eisenchlorid. Es gibt nach Polaillon (*Journ. Anat. Phys. Paris 3. Année 1866 p. 43) zuweilen gute Resultate; so färben sich in den peripheren Ganglien nur die nervösen Elemente, nicht auch das Bindegewebe. Imprägnirt wird mit Eisenchlorid, reduzirt in Tannin, Gallus- oder Pyrogallussäure.

Die Hoggans (*Journ. Quekett Micr. Club 1876; Journ. R. Micr. Soc. London Vol. 2 1879 p. 358) fixiren das Objekt mit Höllenstein, lassen sich das

Silber etwas reduziren, entwässern das Präparat dann mit Alkohol, bringen es in eine 2⁰/₀ige alkoholische Lösung von Eisenchlorid, nach einigen Minuten in eine gleiche von Pyrogallussäure, endlich nach genügender Schwärzung in Wasser und von da in Glycerin.

Fol fixirt die Objekte mit Eisenchlorid und lässt sie dann 24 Stunden in Alkohol mit einer Spur Gallussäure (Genaueres s. § 76). S. auch oben § 346.

380. **Chlorpalladium** nach Schulze (s. oben § 74). **Berlinerblau** nach Leber (*Arch. Ophthalm. 14. Bd. 1868 p. 300) und Ranvier (Traité 1. Ed. p. 108), nach List s. unten § 642. **Ferrocyankupfer** oder **Bleichromat** nach Leber (ibid.). **Schwefelmetalle** nach Landois (Centralbl. Med. Wiss. 3. Jahrg. 1865 p. 867; Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 497). **Ammoniummolybdänat** nach Merkel und Krause (ibid. p. 96; Fol, Lehrbuch p. 180); nach Heine (Zeit. Phys. Chemie 22. Bd. 1896 p. 132: „salpetersaure Ammoniummolybdatlösung", nachher Zinnchlorür). **Rutheniumoxychlorid** nach Nicolle & Cantacuzène (Ann. Inst. Pasteur Tome 7 1893 p. 331). **Rutheniumroth** nach Eisen (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 200).

Ueber die Imprägnation mit **Fetten** nach Altmann s. § 549.

---

18. Kapitel.

Flüssige und feste Medien zum Untersuchen und Einschliessen der Objekte.

381. Einleitende Bemerkungen. In diesem Kapitel sollen die Medien besprochen werden, worin ein Objekt mit dem Mikroskop untersucht werden kann. Die alte Unterscheidung zwischen sogenannten indifferenten Medien und solchen, die auf die Gewebe irgend eine Wirkung ausüben, scheint mehr irre zu führen, als zu helfen, denn kein einziges Medium ist ja absolut wirkungslos mit Ausnahme des Saftes, der das Gewebe im Leben umgibt, und selbst dieser ist es nur, so lange er in situ wirkt; nimmt man hingegen ein Stück Gewebe aus dem Organismus heraus und bringt es auf den Objektträger, so schafft man schon damit künstliche Bedingungen.

Eine besondere Gruppe brauchen die Einschliessmedia nicht zu bilden, denn man kann in alle präservirenden Medien einschliessen; allerdings sind die einzigen, die eine absolut sichere Erhaltung weicher Gewebe verbürgen, harziger Natur (s. § 429 ff.). Wie man mit flüssigen Medien Dauerpräparate herstellen kann, ist im Anfang des Kapitels 19 auseinandergesetzt.

Wässerige oder alkoholische Medien.

382. Destillirtes Wasser. Um es vor dem Verderben zu bewahren, schliesse man das Vorrathgefäss mit einem Kork, durch den ein kurzes offenes Rohr geht, dessen anderes Ende nach unten gebogen ist. So hat wohl die Luft, nicht aber der Staub freien Zutritt. Das Wasser kann ohne Schaden, mitunter sogar wegen seines geringen Refraktionsindex mit grossem Nutzen, zur Untersuchung von Geweben, die mit Osmiumsäure, Chromsäure oder Salzen der Schwermetalle konservirt worden sind, gebraucht werden, taugt dagegen absolut nicht für frische Gewebe. Es ist — und hierauf achte der Anfänger besonders — durchaus nicht indifferent: manche Elemente der Gewebe, z. B. die Endorgane der Nerven, verändern sich darin erheblich, andere, z. B. die rothen Blutkörperchen, gehen bei längerem Verweilen darin ganz zu Grunde.

383. Allgemeines über die indifferenten Medien. Will man Wasser für frische Gewebe unschädlich machen, so muss man ihm zunächst die Dichtigkeit des Gewebesaftes verleihen, um die so sehr schädliche Osmose auszuschliessen. Dies kann man z. B. durch Zusatz von Kochsalz erreichen. Da aber in den Zellen auch kolloide Substanzen vorhanden sind, so muss man dem Medium ausser dem Salze die richtige Menge eines Kolloids zusetzen, z. B. indem man es mit Eiweiss vermischt.

384. Normalsalzwasser (sogenannte physiologische Salzlösung): 0,75 % Chlornatrium in destillirtem Wasser gelöst. CARNOY empfiehlt den Zusatz einer Spur von Osmiumsäure.

Nach LOCKE (*Boston Med. Surg. Journ. 1896 N. 18; Centralbl. Phys. 10. Bd. 1896 p. 514) muss man, um eine indifferente Flüssigkeit zu erhalten, zur isotonischen Lösung von Chlornatrium — diese ist nach HAMBURGER 0,9 bis 1% — 0,01% Chlorkalium und 0,02% Chlorcalcium setzen. Für die Erythrocyten empfiehlt MALASSEZ (C. R. Soc. Biol. Paris (10) Tome 3 1896 p. 504 und 511) etwa 1%, für das Blut von *Rana* DEKHUYZEN (Onderz. Phys. Lab. Leiden (2) Deel 4 1900 p. 149) 0,8% Chlornatrium.

Für die Selachier der Nordsee gibt MUSKENS (Tijd. Nederl. Dierk. Ver. (2) Deel 4 1894 p. 314) 2¼% Chlornatrium an; RODIN (C. R. Acad. Sc. Paris Tome 131 1900 p. 1009) hat je nach der Species 1,5—2,6% ermittelt.

Für die wirbellosen Wasserthiere scheint allgemein das äussere Medium isotonisch zu sein.

385. Normalsalzwasser für Blut. HAYEM (C. R. Soc. Biol. Paris (11) Tome 1 1899 p. 265) empfiehlt zur Zählung der Blutkörperchen ein Gemisch von 200 ccm destill. Wasser, 1 g Chlornatrium, 5 g Natriumsulfat und 3—4 ccm Jodjodkaliumlösung (1 g Jodkalium auf 20 ccm Wasser, dazu Jod im Ueberschuss).

386. Chlormangan nach PICTET (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1891 p. 89): eine 5—10%ige Lösung von Chlormangan in destillirtem Wasser mit einem geringen Zusatz einer Lösung von Dahlia. Nach meiner (LEE) Erfahrung ist es ausgezeichnet. Indessen hat die Lösung nur für Seethiere die richtige Konzentration, für Landthiere sollte sie schwächer sein (1—3 %).

387. Jodserum, von SCHULTZE (Arch. Path. Anat. 30. Bd. 1864 p. 263) eingeführt. RANVIER (Traité 1. Ed. p. 76) empfiehlt nur das Amnioswasser von Säugethieren. Man nehme einen ganz frischen Uterus vom Schafe oder der Kuh (in grossen Schlachthäusern leicht

zu haben), steche ihn an, fange das Serum in einer Flasche auf, werfe Stückchen Jod hinein und lasse es einige Tage unter häufigem Umschütteln damit in Berührung. Oder man mischt Serum mit viel Jodtinktur, lässt absetzen, filtrirt und erhält so ein sehr stark jodirtes Serum; von diesem gibt man alle 2—3 Tage ein wenig zu dem Serum, das man benutzen will. Uebrigens nimmt auch das Serum, wenn man es mehrere Wochen über Jod stehen läst, immer mehr davon auf, wird dunkelbraun und dient dann noch besser als das vorige zum Jodiren des frischen Serums in verschiedenen Stärken. Im Allgemeinen darf es zum Maceriren nur hellbraun sein, verliert es aber dabei seine Farbe, so muss man frisches hinzufügen.

388. Humor aqueus. Hühnereiweiss. Beide brauchen nur filtrirt zu werden. Jodirung nach Belieben. Für Sporozoen nimmt Wasielewski (Sporozoenkunde Jena 1896 p. 153) ein Gemisch von 20 ccm Hühnereiweiss, 200 ccm Wasser und 1 g Kochsalz, für Cercariäen Hofmann (Z. Jahrb. Abth. Syst. 12. Bd. 1899 p. 176) 1 Th. Eiweiss und 9 Th. Normalsalzwasser (dazu etwas Kampher).

389. Künstliches Jodserum nach Frey (Mikroskop 6. Aufl. Leipzig 1877 p. 75): destillirtes Wasser 270 ccm, Eiweiss 30 ccm, Chlornatrium $2^1/_2$ g; man filtrirt und setzt Jodtinktur hinzu.

390. Künstliches Serum nach Kronecker (s. Vogt & Yung, Lehrb. Vergl. Anat. 1888 1. Bd. p. 478): Seesalz 6 g, Aetznatron 0,06 g, Wasser 1 Liter. — Böhm & Oppel (Taschenbuch 3 Aufl. 1896 p. 19) nehmen statt des Aetznatrons die gleiche Menge Natriumkarbonat.

391. Blutserum. Moore (Journ. Morph. Boston Vol. 13 1897 p. 342) verwendet für *Bdellodrilus*, speziell seine Nephridien, ein Gemisch gleicher Theile von destillirtem Wasser und Blut von *Astacus fluviatilis*.

Migula (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1890 p. 172) gibt eine sehr umständliche, überflüssige Art an, ein Gemisch von Blutserum und Glycerin zu bereiten.

Garbini (Manuale Techn. Mod. Micr. 4. Ed. Milano 1899 p. 75) empfiehlt als „Muschelwasser" das Blut von *Anodonta* oder anderen Muscheln (mit etwas Natriumsalicylat als Antiseptikum).

392. Zuckersaft. Zucker wird im gleichen Gewicht Wasser heiss gelöst. Ist (auch in grösserer Verdünnung) für manche Gewebe ein ausgezeichnetes Medium. Gegen den Schimmel setze man 1—7 %

Chloralhydrat oder 1% Karbolsäure hinzu. Auch zum Einschluss kann der Saft dienen, aber der Zucker kristallisirt gern aus (s. unten § 416).

393. **Chlorcalcium** nach SCHACHT (Mikroskop Berlin 1862 p. 279) und HARTING (Mikroskop 2. Aufl. 1886 2. Bd. p. 297): die wässerige Lösung entweder gesättigt oder mit 4—8 Theilen Wasser verdünnt. Bricht das Licht ziemlich schwach (s. oben p. 71) und trocknet nicht ein.

394. **Kaliumacetat** nach SCHULTZE (Arch. Mikr. Anat. 7. Bd. 1872 p. 180). Eine nahezu gesättigte Lösung in Wasser. Trocknet nicht ein, bricht das Licht nicht so stark wie Glycerin (s. oben p. 71) und soll auch die Schwärzung der mit Osmiumsäure konservirten Objekte verhindern.

395. **Chloralhydrat.** Wässerige Lösung: entweder 5% (LAWDOWSKY in: Arch. Mikr. Anat. 13. Bd. 1877 p. 359) oder 1% (MUNSON in: Journ. R. Micr. Soc. London f. 1881 p. 847).

396. **Alkohol.** Zum Einschluss nicht besonders geeignet, da er schwach nicht gut konservirt, stark aber den Kitt um das Deckglas angreift. Er dient übrigens ja hauptsächlich nur zur vorläufigen Aufhebung von Objekten, die noch weiter verarbeitet werden sollen. S. hierüber oben p. 5.

397. **Methylalkohol.** Wegen seiner schwachen Lichtbrechung (s. oben p. 71) ist er unter Umständen als Medium zum Beobachten wichtig. So hat ihn RABL (Anat. Anzeiger 4. Jahrg. 1889 p. 30) bei seinen Untersuchungen über die Zelltheilung benutzt; die Präparate hielten sich aber nur einige Tage.

398. **Formaldehyd.** S. oben §. 106.

399. **Gemisch von Gilson** (Carnoy, Biologie cellullaire p. 94): 60%iger Alkohol 60 ccm, Wasser 30, Glycerin 30, Essigsäure (15 Theile Eisessig und 85 Theile Wasser) 2 ccm, Sublimat 0.15 g. Ist gut zum Studium feiner Zellstrukturen an fixirten Objekten, nicht aber zum Aufbewahren (dies gilt auch von den folgenden Gemischen, § 400—403).

400. **Eiweiss und Sublimat** nach GAGE (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 223): Eiweiss 15 ccm, Wasser 200 ccm, Kochsalz 4 g, Sublimat 0,5 g. Zu filtriren und kühl aufzubewahren. Empfohlen zum Studium von rothen Blutkörperchen und Flimmerzellen.

401. **Gemische von Pacini** (Giorn. Internaz. Sc. Med. (2) Vol. 2 1880; *Journ. Microgr. Paris Tome 4 1880 p. 136, 191 u. 235). Sublimat ($^1/_2$—$^1/_3$%) in Wasser gelöst mit Kochsalz oder Essigsäure. Ganz antiquirt und überflüssig.

402. Gemisch von Goadby (s. Harting, Mikroskop 2. Aufl. 1866 3. Bd. p. 418). Eine Lösung von Kochsalz, Alaun und ganz wenig Sublimat in Wasser. Ganz ungeeignet für histologische Zwecke.

403. Gemisch von Owen (Vogt & Yung, Lehrb. Vergl. Anat. 1. Bd. 1888 p. 18). Aehnlich dem vorigen.

404. Kupfersalze nach Ripart & Petit (Carnoy, Biologie cellulaire p. 95): Kampherwasser (nicht gesättigt) und destillirtes Wasser je 75 ccm, Eisessig 1 g, Kupferacetat und Chlorkupfer je 0,30 g. Für zarte frische Gewebe werthvoll; kann auch mit Methylgrün zusammen angewandt werden. Eine Spur Osmiumsäure oder Sublimat erhöht die Wirkung als Fixirmittel. S. auch oben p. 53 § 85.

405. Tannin nach Carnoy (l. c.). Eine $^1/_2$ $^0/_0$ige Lösung von Tannin in destillirtem Wasser. Dient als Beobachtungsmittel.

406. Pikrokarmin. Wurde von Ranvier als Medium für das Zerzupfen frischer Gewebe empfohlen, da er die Form der Zellen darin fixirt zu sehen glaubte. Carnoy hat sich aber bereits dagegen ausgesprochen. S. auch § 228.

407. Methylgrün. In ziemlich konzentrirter wässeriger Lösung ist es recht gut zum Beobachten frischer Gewebe, die es leidlich fixirt, noch besser allerdings durch Zusatz einer Spur von Osmiumsäure. S. im Uebrigen § 281.

408. Gemisch von Wickersheimer (Z. Anzeiger 2. Jahrg. 1879 p. 670). Ganz unbrauchbar.

409. Gemische von Meyer (Arch. Mikr. Anat. 13. Bd. 1876 p. 868): Holzessig mit etwas Salicylsäure darin, dazu viel Glycerin und Wasser. Soll sich gut zum Aufheben von Infusorien, Nematoden, *Hydra* etc. eignen.

410. Gemisch von Noll (Z. Anzeiger 6. Jahrg. 1883 p. 472): gleiche Theile des einen Gemisches von Meyer (§ 409) und des von Farrants (§ 418). Soll kleine Crustaceen und ihre Larven sehr gut konserviren, ebenso gehärtete und gefärbte Hydroiden, Medusen und andere Cölenteraten.

411. Gemisch von Hoyer (Biol. Centralbl. 2. Jahrg. 1882 p. 23). Ein hohes Glas mit weitem Halse wird zu zwei Dritteln mit Stücken von Gummi arabicum gefüllt und dann bis an den Hals voll gegossen entweder mit einer Lösung von Kaliumacetat (oder Ammoniumacetat) oder mit einer mehrprozentigen Lösung von Chloralhydrat, die 5—10 $^0/_0$ Glycerin enthält. Unter häufigem Umschütteln löst sich das Gummi in einigen Tagen zu einem Syrup, der, durch „Wollpapier" (dicken Filz von Filtrirpapier) filtrirt, sich lange klar hält; sollten sich Pilze zeigen, so wird das Chloralhydrat zugesetzt und nochmals filtrirt. Das Gemisch mit Chloralhydrat dient für Präparate, die mit Karmin

oder Hämateïnthonerde gefärbt sind, das andere für die mit Theerfarbstoffen tingirten.

412. Gemisch von Langerhans (Z. Anzeiger 2. Jahrg. 1879 p. 575): Gummi arabicum und Wasser je 5 g; nach 12 Stunden fügt man hinzu Glycerin 5 g, 5%ige Lösung von Karbolsäure 10 g.

413. Gemisch von Farrants (*Beale, How to work etc. p. 58): auserlesene Stücke von Gummi arabicum und Wasser je 10, Glycerin 5 g. In gut verschlossener Flasche mit einem Stück Kampher aufzubewahren. (Andere Vorschriften lauten ähnlich, schreiben aber etwas arsenige Säure vor.)

414. Gemisch von Shimer (*The Microscope Vol. 9 1889 p. 138; Journ. R. Micr. Soc. London 1890 p. 411): gleiche Theile von Glyceringelatine nach Fols 2. Formel (unten § 425 N. 6), Gemisch von Farrants und Glycerin.

415. Gemisch von Faris (*The Microscope Vol. 10 1890 p. 59; Journ. R. Micr. Soc. London 1890 p. 514): Gummi arabicum 60 g, Glycerin und Wasser je 45 g, Thymol 1 g. Heiss zu lösen und zu filtriren.

416. Gemisch von Apáthy (s. oben p. 205). Dieses Gemisch von Gummi, Zucker und Wasser wird von Apáthy ganz allgemein zum Einschliessen von Präparaten empfohlen. Es wird sehr hart und kann zum Umrahmen von Glycerinpräparaten dienen. Allerdings ist es stark sauer.

Ich (Mayer) habe vor etwa 21 Monaten mit diesem Gemisch ein in Methylsalicylat liegendes Präparat umrahmt; es ist noch jetzt ganz unverändert.

Apáthy bereitet es (s. Behrens, Tabellen 3. Aufl. 1898 p. 70) jetzt, indem er je 25 g Pulver von Gummi und Zucker in 50 ccm Wasser (dazu $^1/_2$ g Natriumsalicylat) löst und dann im Wasserbade auf die Hälfte eindampft.

Jackson (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 14 1874 p. 139) setzt dem Zuckersyrup, um das Kristallisiren zu verhüten, 3—4% Chlorcalcium zu. Nach meinen (Mayer) Erfahrungen aber vergeblich.

417. Gemisch von Fabre-Domergue (*La Nature 1889 No. 823): Syrup von Traubenzucker (vom spez. Gew. von 1,20) 10, Methylalkohol 2, Glycerin 1 Theil, Kampher, so viel sich löst. Der Traubenzucker wird heiss gelöst. Die Säure des Gemisches muss mit ein wenig Soda oder Pottasche abgestumpft werden. Es soll fast alle Farben unverändert konserviren.

418. Neueres Gemisch von Fabre-Domergue (Neuville in: Bull. Soc. Philomath. Paris (9) Tome 1 1899 p. 115): 200 Th. Zucker in 400 Th. Wasser kalt zu lösen, dazu 1 Th. Formaldehyd (also $2^1/_2$ Th. käufliches Formol),

Kampher, so viel sich löst. Ebenfalls zu neutralisiren; die Objekte sind erst in das mit Wasser verdünnte Gemisch zu bringen.

419. **Gemisch von Brun** (*nach Fabre-Domergue, Prem. principes du microscope Paris 1889 p. 123): destill. Wasser 14, Traubenzucker 4, Kampherspiritus und Glycerin je 1 Theil; der ausfallende Kampher wird abfiltrirt. — Nach Henneguy, der mich (Lee) auf dies Gemisch aufmerksam macht, ist es besser als Glycerin, da es die Theerfarbstoffe, auch Methylgrün, nicht auszieht.

420. **Lävulose** (Fruchtzucker), bereits von Wedl (Arch. Path. Anat. 74. Bd. 1878 p. 143) angewandt, wird von Schiefferdecker (Das Mikroskop etc. 1889 p. 224) als Einschliessmittel empfohlen. Sie kristallisirt nicht, schadet den Färbungen mit Karmin und Theerfarbstoffen nicht und bricht das Licht etwas stärker als das Glycerin. Die Objekte kann man direkt aus Wasser hineinlegen.

421. **Glycerin.** Mit Wasser verdünntes Glycerin dient häufig als Medium zum Untersuchen und Einschliessen; die Verdünnung ist oft rathsam, da die Verringerung der Brechbarkeit des Glycerins manche Einzelheiten in den Objekten besser sichtbar macht. Will man aber einen sicheren Einschluss haben, so wähle man das Glycerin konzentrirt.

Glycerin löst in Präparaten mit Kalknadeln etc. etwas Calciumkarbonat auf, ist daher zu vermeiden.

422. **Gemisch von Henking** (Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1898 p. 165) zum Untersuchen des Inhaltes frischer Eier von Insekten: Wasser 80 ccm, Glycerin 16, Ameisensäure 3, 1%ige Osmiumsäure 1 ccm, Dahlia 0,04 g; solche Präparate lassen sich auch einfach durch Aufkitten des Deckglases permanent machen.

423. **Besonders stark lichtbrechendes Glycerin.** Der Refraktionsindex von Glycerin (1,47) kann durch Zusatz von Chlorcadmium auf 1,504, von Chloralhydrat (bis zur Sättigung) auf 1,51, von Zinkjodat auf 1,56 erhöht werden. Hierdurch lassen sich die homogenen Linsen besser ausnützen.

424. **Glycerin und Alkohol.** Gemische dieser beiden Stoffe sind von grossem Nutzen, da sie die Ueberführung zarter Objekte von schwachem in starkes Glycerin möglich machen. Man legt das Objekt nämlich direkt aus dem Alkohol in einen Tropfen davon ein und lässt diesen sich an der Luft durch die Verdunstung des Alkohols allmählich konzentriren, worauf man entweder das Präparat direkt umrahmt oder das Objekt in reines Glycerin (oder Glyceringelatine) legt.

a) nach Calberla (Zeit. Wiss. Z. 30. Bd. 1878 p. 442): Glycerin 1, Alkohol (Stärke nicht angegeben) 2, Wasser 3 Theile. Aeusserst brauchbar, auch (oben p. 5) manchmal besser als reiner

Alkohol zum Aufbewahren fixirter Thiere, die noch weiter verarbeitet werden sollen.

b) nach Lee: Glycerin und Alkohol von 96 % je 1, Wasser 2 Theile. Für sehr zarte Objekte empfehlenswerth.

c) nach Hantsch (in: *Reinicke, Beiträge neu. Mikrosk. 1862 Heft 3 p. 37): Glycerin 1, absol. Alkohol 3, Wasser 2 Theile.

d) nach Jäger (Vogt & Yung, Lehrb. Vergl. Anat. 1. Bd. 1888 p. 16): Glycerin und Alkohol je 1, Seewasser 10 Theile.

425. Glyceringelatine. Sie ist bereits 1862 von Schacht (Mikroskop Berlin 1862 p. 281) und 1869 von Klebs (Arch. Mikr. Anat. 5. Bd. p. 166) zum Einschliessen empfohlen worden. Nach Klebs mischt man eine konzentrirte Lösung von Hausenblase mit dem halben Volumen Glycerin.

Auch Behrens (Tabellen 3. Aufl. 1898 p. 70) verwendet Hausenblase (25 g in 100 ccm heissem Kampherwasser zu lösen, mit 100 ccm Glycerin zu mischen, unter Umrühren bis zum Schäumen zu kochen und heiss durch feuchte Glaswolle zu filtriren); ebenso Beale (*How to work etc. p. 57).

Meist nimmt man jedoch gewöhnliche Gelatine.

So verfahren:

1. Schacht (l. c.): 1 Th. Gelatine, 3 Th. Wasser, 4 Th. Glycerin.

2. Deane (Frey, Mikroskop 6. Aufl. Leipzig 1877 p. 134): 1 g Gelatine, 2 g Wasser, 4 g Glycerin; Lawrence klärt die Gelatinelösung durch Kochen mit Eiweiss, filtrirt sie und setzt ihr etwas Kampherwasser zu.

3. Beale (*How to work etc. p. 57): man lässt (Hausenblase oder) Gelatine quellen, bringt sie zum Schmelzen (klärt sie, falls erwünscht, nach Lawrence) und gibt das gleiche Volumen Glycerin hinzu.

4. Brandt (*Zeit. Mikr. Berlin 2. Bd. 1880 p. 69): geschmolzene Gelatine 2, Glycerin 3 Theile. Man filtrirt durch Glaswolle, während der Trichter auf eine einfache Art (s. im Original) warm gehalten wird. Einige Tropfen Karbolsäure werden dem Filtrat zugesetzt. Die Objekte werden, bevor man sie auf den Objektträger bringt, in einem Fläschlein voll warmer Glyceringelatine mit dieser durchtränkt.

5. Kaiser (*Bot. Centralbl. 1. Jahrg. 1880 p. 25): 7 g beste französische Gelatine weicht man 2 Stunden lang in 42 g destill. Wasser ein, gibt 50 g Glycerin und 1 g Karbolsäure hinzu, erwärmt unter Umrühren 10—15 Minuten und filtrirt heiss durch befeuchtete feinste Glaswolle.

6. Fol (Lehrbuch p. 138) gibt gleich drei Vorschriften:

a) 1 Volumen von Beales Gelatine und ½ Volumen Wasser, als Antiseptikum Salicylsäure, Karbolsäure oder Kampher.

b) Gelatine 30, Wasser 70, Glycerin 100 Theile zu mischen, nachher dazu Kampherspiritus 5 Theile.

c) Gelatine 20, Wasser 150, Glycerin 100, Kampherspiritus 15 Theile.

7. Squire (Methods p. 84): man weicht 100 g Gelatine in Chloroformwasser ein, lässt dieses, wenn sie weich geworden, ablaufen und löst die Gelatine warm in 750 g Glycerin auf. Dann fügt man ein Gemisch von 400 g Chloroformwasser und etwa 50 g frischem Hühnereiweiss hinzu, kocht das Ganze 5 Minuten lang, füllt mit Chloroformwasser bis zu 1550 g auf und filtrirt warm.

8. Gilson (nach brieflicher Mittheilung an Lee): 1 Volumen vorher eingeweichter und dann geschmolzener Gelatine vermischt man mit 1 Volumen konzentr. Glycerin, wirft so viel Chloralhydrat hinein, bis das Volumen sich um die Hälfte vermehrt, und erwärmt bis zur völligen Lösung. Das Gemisch bricht das Licht sehr stark und kann daher für undurchsichtige Gewebe nützlich werden. — Eine ähnliche Vorschrift hat Geoffroy (*Journ. Bot. 1893 p. 55; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 476) gegeben: 3—4 g Gelatine, 100 ccm einer 10%igen Lösung von Chloralhydrat.

So angenehm es auch sein mag, in ein Medium einschliessen zu können, das, ohne ein Harz zu sein, kalt einigermassen hart ist, so möchte ich (Mayer) für feinere Arbeiten doch von der Glyceringelatine abrathen. Denn nicht nur ist sie nicht leicht absolut klar zu bekommen und zu erhalten, sondern man muss sie natürlich auch warm verwenden. Ferner ist das Durchtränken der Objekte mit ihr vor dem definitiven Einschliessen recht mühsam. Speziell für Zupfpräparate oder feine Dissektionen von kleinen Crustaceen, Würmern etc. zur Analyse von deren Gliedmassen, Borsten u. dgl., wofür sie besonders in England sehr gebräuchlich ist, möchte ich sie gar nicht empfehlen: sie hält den Vergleich mit reinem oder verdünntem Glycerin lange nicht aus.

426. Kaliumquecksilberjodid nach Stephenson (Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 2 1882 p. 167). Jodkalium und Quecksilberjodid werden zusammen in Wasser gelöst, aber so, dass von beiden ein Theil ungelöst bleibt. Die Flüssigkeit hat dann ein spezif. Gewicht von 3,02 und den Refraktionsindex n = 1,68. Durch Verdünnen mit Wasser lassen sich alle niedrigeren Indices erhalten. Die Deckgläser sind mit Wachs zu verkitten und dann noch mit 2 oder 3 Anstrichen von Goldgrund (§ 456) und einem von Schellack zu versehen.

Ich (Lee) habe mit verschiedenen Lösungen Versuche angestellt. Für permanente Präparate taugen sie nicht, weil sich Präzipitate in der Lösung bilden. Dagegen können sie zum Beobachten mitunter gute Dienste leisten, da ja die Gewebe ohne Entwässerung darin als in einem Medium liegen, das das Licht stärker bricht als irgend ein Harz.

Behrens (Tabellen 3. Aufl. 1898 p. 71) gibt die Vorschrift: 65 g Quecksilberjodid, 50 g Jodkalium, 25 ccm Wasser; zu filtriren. Der Index ist 1,712, wird aber (nach Amann in: Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 21) statt Wasser Glycerin genommen, so erhöht er sich auf 1.78 bis 1.80.

427. Monobromnaphthalin. Vergl. FLESCH (Z. Anzeiger 5. Jahrg. 1882 p. 555); ABBE und VAN HEURCK (Journ. R. Micr. Soc. London Vol. 3 1880 p. 1043; ibid. f. 1898 p. 246).

428. Andere stark lichtbrechende Medien. Das von THOMPSON (Journ. R. Micr. Soc. London f. 1892 p. 902) besteht aus Brom, Schwefel und arseniger Säure.

MADAN (ibid. f. 1898 p. 273) empfiehlt von allen nur Methylenjodid ($CH_2 I_2$) = 1.743 zum temporären Aufbewahren von Präparaten, und zum definitiven nur ein Gemisch von 4 Th. Piperin und 1 Th. Kanadabalsam (Index = 1.657).

Oele, Harze und Balsame.

429. Allgemeines. Harze und Balsame sind Lösungen von glasigen oder amorphen Substanzen in ätherischen Oelen. Durch Destillation oder Trocknen an der Luft verlieren sie das Oel und werden fest. Nur diese festen Harze sollten in der Mikrotechnik verwandt werden; die rohen Harze enthalten nämlich stets etwas Wasser, das ihre klare Löslichkeit in den gewöhnlichen Mitteln erschwert, den optischen und auch den konservirenden Eigenschaften Eintrag thut und besonders den gefärbten Präparaten schädlich ist. Man trockne also das Harz (den Balsam) bei gelinder Wärme, sodass es in der Kälte spröde ist, und löse es dann in einem geeigneten Mittel. Solche harten Harze findet man auch käuflich.

Die Lösungen in flüchtigen Medien, z. B. Xylol oder Chloroform, werden rasch wieder hart, aber auch brüchig. Nimmt man dagegen zur Lösung ein weniger flüchtiges Medium, z. B. Terpentinöl, so ist das erst viel später der Fall. Man brauche daher jene nur, wenn das Präparat rasch trocken werden soll, diese dagegen immer, wenn man in erster Linie ein möglichst dauerhaftes Präparat haben will.

FOL (Lehrbuch p. 139) nimmt zum Lösen Eukalyptusöl, das nach ihm ähnlich dem Terpentinöl wirkt.

Ueber die bekannte Thatsache, dass sich die Luftbläschen, die beim Einschliessen der Objekte in Harze leicht in letzteren auftreten, nach kurzer Zeit von selbst wieder verlieren, s. ZOTH (Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1898 p. 192). Nicht zu verwechseln damit ist die mitunter ganz fatale Erscheinung, dass sich Objekte mit schwer durchlässigen Wänden, z. B. Arthropoden mit dickem Chitin, oft schon beim Uebertragen aus dem Alkohol in das Intermedium, meist aber erst im Harz, ja, zuweilen erst, nachdem sie bereits Jahre lang darin gelegen haben, ganz oder zum Theil mit Luft füllen. Sie werden dadurch natürlich undurchsichtig; gewöhnlich ist die Luft gar nicht mehr oder nur mühsam und theilweise wieder aus ihnen fortzuschaffen. Wahrscheinlich ist es übrigens keine atmosphärische Luft, sondern ein Gas, das aus den Intermedien stammt. S. auch oben p. 69.

430. Wahl des Einschliessmittels. Kein einziges Medium von den vielen, die bereits seit lange im Gebrauch sind, wird allen Ansprüchen genügen können. Es handelt sich also zunächst darum, letztere zu präzisiren.

Bedarf man eines Mediums von hohem Refraktionsindex, so wird man entweder Kanadabalsam in Benzol (oder einem anderen stark brechenden Kohlenwasserstoff) gelöst oder Cedernöl nehmen. Letzteres hält sich völlig gut und wird auch mit dem Alter dick genug, um das Deckglas fest zu halten; übrigens kann man ja die Präparate mit einem Kitt umrahmen. Und hat man ein frisches Präparat mit der Oelimmersion betrachtet, so kann man stets leicht das Deckglas wechseln, indem man es durch einen Tropfen Cedernöl, den man am Rande zusetzt, zum Schwimmen bringt und dann wegschiebt. — Schwächere Indices gewähren dagegen Dammarharz oder auch eine Lösung von Kolophonium in Terpentinöl.

Hat man mit zarten Färbungen zu thun, so ist bei den Theerfarbstoffen in der Regel Harz in Chloroform gelöst nicht brauchbar; ebenso ist den Färbungen mit Hämateïnthonerde meist das Terpentinöl als Solvens des Harzes schädlich.

Will oder muss man die Präparate rasch hart haben, so nehme man Chloroform oder Benzol zum Lösen des Harzes. Allerdings hat das rasche Trocknen auch seine Nachtheile. Wer z. B. Benzolbalsam braucht, muss zuweilen zwischen Deckglas und Objektträger Papierstreifen legen, um die Schnitte vor dem Zerdrücken beim Austrocknen des Balsams zu schützen. Das ist bei Terpentinöl oder Xylol nicht nöthig. Auch behalten die Harzlösungen dann ihren Refraktionsindex viel länger bei, als die mit flüchtigen Medien, da in letzteren mit dem Alter die Präparate oft so durchsichtig werden, dass viele Einzelheiten verloren gehen.

Man kann solche Präparate einfach dadurch wieder gut machen, dass man sie, ohne das Deckglas abzunehmen, auf 1 bis 2 Tage in Benzol legt; dieses dringt in den Balsam ein und erniedrigt seinen Index wieder. Die Sichtbarkeit feiner Einzelheiten ist nämlich proportional der Differenz zwischen dem Index des Objektes und dem des Mediums; da nun die fixirten Gewebe meist einen etwas höheren Index haben als Kanadabalsam, so nimmt durch Herabsetzung des Index des Balsams die Sichtbarkeit zu, und das Desideratum ist stets nur das, ein Medium zu finden, dessen Index eine gute Sichtbarkeit verbürgt und doch nicht so niedrig ist, dass er die homogenen Immersionssysteme in ihrer Leistung sehr beeinträchtigt.

In vielen Fällen endlich lässt sich das Intermedium ganz umgehen, indem man die Objekte direkt aus dem Alkohol in das Harz bringt. Letzteres muss aber hierzu selber in Alkohol gelöst sein, und das ist nur mit wenigen derart möglich, dass nicht die Präparate schon in kurzer Zeit unbrauchbar werden (z. B. Sandarak, § 440). Wo es aber sich machen lässt, da soll man ja das Intermedium vermeiden. Aus all diesen Gründen lässt sich im Allgemeinen das Kolophonium mit Terpentinöl empfehlen; jedoch ist es für Präparate, die mit Hämateïnthonerde gefärbt sind, nicht brauchbar. Will man einen höheren Index, so nehme man für die Präparate mit Theerfarben Cedernöl oder Xylolbalsam, für die mit Karmin oder Eisenhämatoxylin Alkoholbalsam oder noch besser Vosselers Terpentin.

Unna (Monatsh. Prakt. Dermat. Ergänzgsh. 1885 p. 47 ff.) folgert aus seinen Versuchen über die Haltbarkeit der Färbung mit Fuchsin in Oelen etc., dass die Entfärbung in den Balsamen auf ihrem „Sättigungsbestreben für Sauerstoff" beruht. Am stärksten ist dieses bei Nelkenöl, Balsam in Chloroform oder Terpentinöl gelöst, Dammar in Terpentinöl, Balsam in Gaultheriaöl oder Benzol etc., viel geringer bei Dammar in Xylol, bei Xylol, Cedernöl und Gaultheriaöl, gar nicht vorhanden bei Benzol etc.

431. Kanadabalsam. Man löse festen Balsam (§ 429) in Xylol, Benzol, Chloroform oder Terpentinöl bis zur gewünschten Konsistenz auf. Terpentinöl nehme man nur, wenn man ein sehr langsam erhärtendes Medium haben will, sonst aber ist für die meisten Objekte Xylol am besten, und Benzol hat nur dann einen Zweck, wenn man sehr eilig ist, denn Benzolbalsam wird viel rascher hart als Xylolbalsam.

Sahli (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 5) empfiehlt zur Lösung Cedernöl. S. auch § 625 (Eisig).

Chloroform zum Lösen des Balsams hat bereits 1865 Böhmer (Arch. Mikr. Anat. 4. Bd. 1868 p. 346) benutzt.

Neutraler Balsam. Unna (Monatsh. Prakt. Dermat. Ergänzgsh. 1885 p. 58) hat den Balsam durch Ammoniak zu neutralisiren versucht, aber mit schlechtem Erfolg.

Colucci (Giorn. Ass. Med. Natural. Napoli Anno 7 1897 p. 172) neutralisirt ihn durch Natrium- oder Kaliumkarbonat. Ich (Mayer) habe von C. selber solchen Balsam zur Probe gehabt: er bleibt in nicht zu grossen Gefässen bei Abschluss von der Luft ganz neutral, wird aber beim Trocknen wieder leicht sauer.

Grübler & Hollborn bereiten seit einigen Jahren ebenfalls einen ganz neutralen Kanadabalsam, in dem sich mir (Mayer) sehr empfindliche Präparate, die in jeder anderen Art von Balsam sofort verblassten, viele Monate unverändert

gehalten haben. Allerdings wird sowohl der trockene Balsam als auch seine Lösung nach einiger Zeit wieder etwas sauer (es ist eine flüchtige Säure dabei im Spiel), aber der gewöhnliche Balsam reagirt doch so sehr viel saurer als der neutrale, dass letzterer für zarte Färbungen entschieden zu empfehlen ist.

432. Alkoholbalsam nach Seiler (Proc. Amer. Soc. Micr. Vol. 2 1881 p. 60; Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 2 1882 p. 126). Trockener Balsam wird in warmem absolutem Alkohol gelöst und durch „absorbent cotton" filtrirt. Seiler sagt, man könne die Objekte direkt aus absolutem Alkohol in diesen Balsam bringen, und so werde nicht nur jede Schrumpfung vermieden, sondern auch das Fett in den Zellen nicht aufgelöst. Ich (Lee) finde, die direkte Uebertragung ist doch nicht sehr einfach, und empfehle sie daher im Allgemeinen nicht. Hat man aber in der gewöhnlichen Weise das Objekt vorher durch Xylol (oder ein anderes Intermedium) wandern lassen, so ist der Seilersche Balsam für viele Zwecke gut.

Die Lösung ist sehr haltbar. Man kann bequem damit arbeiten, darf allerdings während des Einlegens der Objekte nicht darauf athmen, weil sonst leicht Wolken darin auftreten. Sie definirt sehr gut, und die Präparate halten sich auch fast unverändert. Allerdings ist sie nicht für die in Alkohol löslichen Theerfarbstoffe geeignet.

433. Dammarharz. Die Medien zum Lösen sind dieselben wie bei Kanadabalsam, und man macht die Lösungen auch genau so wie dort. Am besten ist Xylol; das Harz löst sich darin auch ohne Erwärmen.

Flemming, Pfitzner etc. nehmen ein Gemisch von Benzol oder Benzin und Terpentinöl (Arch. Mikr. Anat. 19. Bd. 1881 p. 322; Morph. Jahrb. 6. Bd. 1880 p. 479 etc.), Martinotti (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 156) nur Xylol, setzt aber hinterher Terpentinöl zu. Vor der Lösung in Chloroform warnt mit Recht Fol (Lehrbuch p. 139).

Gerne erkenne ich (Lee) die besonders scharfe Definition an, die man mit Lösungen von Dammar erhält, bin aber fest davon überzeugt, dass man sich für wirkliche Dauerpräparate auf keine davon verlassen kann: oft schon nach Tagen oder Wochen, spätestens nach Jahren, treten Körnchen darin auf.

Nach meinen (Mayer) allerdings nur geringen Erfahrungen mit Dammar halten sich Präparate und Lösung (in Xylol) ebenso gut wie die mit Kanadabalsam.

Garbini (Manuale Tecn. Mod. Micr. 4. Ed. Milano 1899 p. 137) rühmt sehr ein Gemisch gleicher Theile von Dammar in Terpentinöl und Kanadabalsam in Xylol gelöst.

434. Gum Thus („from a Pinus indigenous to the eastern United States") ist nach Eisen (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 201) besser und viel billiger als Kanadabalsam. Lösung in Xylol.

Meine (Mayer) Versuche mit der Lösung in Xylol und mit dem Harze selber, die mir beide von Eisen zugesandt wurden, ergeben einstweilen, dass Thus dem Balsam wohl gleichwerthig ist. Das Harz löst sich auch in absolutem Alkohol, aber in den Präparaten, die damit angefertigt werden, treten schon bald Kristalle auf. Durch Neutralisirung mit Natronhydrat, das man gleich dem Harz in Alkohol löst, wird letzteres zu braun.

435. Kolophonium. Die Lösung in Terpentinöl wurde zuerst von Kleinenberg (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 19 1879 p. 208) eingeführt. Ich (Lee) kann sie nur auf das Beste empfehlen. Sie wird so langsam hart, dass man die Objekte in aller Ruhe darin hinlegen und ordnen kann. Allerdings ist das auch vom Uebel, wenn man die Präparate schon gleich nach dem Einschluss mit einer Oelimmersion studiren muss.

Vosseler (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1899 p. 297) legt, um dem Verschieben des Deckglases vorzubeugen, ein heisses Stück Draht nach einander der Länge nach an zwei oder an alle vier Seiten des Deckglases an: das flüssige Harz kommt hier sofort ins Kochen und erstarrt nachher gleich; die Schnitte sollen darunter nicht leiden.

Kleinenberg und Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 24) warnen vor dem absoluten Alkohol zur Lösung: die Präparate sind erst schön, verderben aber bald, da sich darin Kristalle oder amorphe Massen ausscheiden. Die Lösung in Terpentinöl hingegen bleibt völlig klar und gibt eine sehr gute Definition des Bildes. Ich (Lee) mache die Lösung so, dass ich in warmes Terpentinöl (im Einbettofen) kleine Stücke Kolophonium (eine recht helle Sorte) werfe, und wenn die Lösung dick genug ist, sie zweimal warm filtrire; das kostet etwa 14 Tage. Die Lösung sollte nicht gar zu dick sein, denn sie wird allmählich doch von selbst etwas dicker.

Wie alle Balsame mit Terpentinöl, so schadet auch dieser den Färbungen mit Hämateïnthonerde.

Rehm (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 387) empfiehlt eine Lösung von 1 Theil Kolophonium in 10 Theilen Benzin zum Einschliessen von Schnitten durch das Nervensystem. Wie Nissl (s. § 689) erwärmt er über der Flamme den Objektträger so lange, bis alles Benzin verdampft ist, und legt dann erst das Deckglas auf. Auch die Lösung von Kolophonium in Chloroform ist brauchbar.

436. Terpentin nach Vosseler (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 292). Man mischt käuflichen venetianischen Terpentin (von Pinus larix) in einem hohen Cylinder mit dem gleichen Volumen 96 %igen Alkohols, lässt das Gemisch 3—4 Wochen an einem warmen Orte stehen und giesst es klar ab. Die Präparate kann man direkt aus

Alkohol hinein legen. Der Brechungsindex ist niedriger als der der oben erwähnten Harze, und so treten feine Einzelheiten besser hervor. Vosseler erwähnt, das seine damals 15 Jahre alten Präparate sich ausgezeichnet darin gehalten haben.

Auch Suchannek (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1891 p. 463) empfiehlt diesen Terpentin; er nimmt zur Lösung das gleiche Volumen neutralen absoluten Alkohols (käuflicher absoluter Alkohol wird mit geglühtem Kupfervitriol und gebranntem Kalk behandelt), schüttelt das Gemisch öfter um und lässt es dann 1—2 Tage in einem Kachelofen stehen, bis es ganz klar und dick genug geworden ist.

Die Färbungen mit Hämateïnthonerde verblassen leider meist in Terpentin rasch, und für Theerfarbstoffe ist er natürlich gar nicht zu brauchen. Mit dieser Einschränkung aber hat Vosseler sein Mittel wohl nicht zu sehr gerühmt. Was es mir (Mayer) am Meeresstrande besonders werthvoll macht, ist seine Eigenschaft, etwas Wasser zu vertragen: man braucht, wie schon Vosseler hervorhebt, die Objekte gar nicht erst in ein Intermedium zu bringen und nicht einmal sorgfältig zu entwässern, vermeidet daher auch bei ganzen Thieren unliebsame Schrumpfungen.

Nach Vosseler kann man Celloidinschnitte direkt aus 96%igem Alkohol einlegen, ebenso die mit Eiweissglycerin aufgeklebten Paraffinschnitte direkt nach dem Wegschaffen des Paraffins, da die Spur Glycerin im Terpentin keine Trübungen hervorruft.

Nach meinen (Mayer) Versuchen mit neutralem Terpentin, den mir Grübler & Hollborn mehrere Male eigens angefertigt haben, ist von der Verwendung desselben abzurathen, da in den Präparaten trübe Stellen auftreten.

437. Cedernöl. Kann ich (Lee) nicht nur als Medium für zeitweilige Beobachtungen, sondern auch zu dauerndem Einschluss aufs Wärmste empfehlen (s. oben p. 253). Auch Israel (Arch. Path. Anat. 105. Bd. 1886 p. 171) verwendet eingedicktes Cedernöl statt Balsam.

438. Photographischer Negativlack nach Weigert (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 209) zum Einschliessen grosser Schnitte ohne Deckglas.

439. Styrax und Liquidambar. S. Fol, Lehrbuch p. 141, ferner *Bull. Soc. Belge Micr. 1884 p. 178 und Journ. R. Micr. Soc. London f. 1883 p. 741; f. 1884 p. 318, 475, 655, 827; f. 1898 p. 246; auch Witt in: Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 196. Sie brechen das Licht sehr stark, taugen daher im Allgemeinen für histologische Zwecke nicht.

440. Sandarak. Keller (Zeit. Wiss. Z. 33. Bd. 1879 p. 333) verwendet ihn in absolutem Alkohol gelöst zum Einlegen von Eiern, die noch von allen Seiten beobachtet werden sollen, also gerollt werden müssen.

Nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 24) erhalten die Präparate im Laufe der Zeit Luftblasen und blättern zuletzt ganz ab. — Aehnliches gibt Fol (Lehrbuch p. 139) an.

441. **Rizinusöl.** Wurde zuerst von Böhmer (s. oben § 249), dann von Grenacher (Abh. Nat. Ges. Halle 16. Bd. 1886 p. 215; Zeit Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 244) speziell für Schnitte von Cephalopodenaugen empfohlen, da der niedrige Brechungsindex (n = 1.48, bei Kanadabalsam = 1.54) die Sichtbarkeit der stärker brechenden Gewebe erhöhen würde. Ich (Lee) habe an anderen Objekten keine guten Resultate erzielt.

442. **Leinöl** mit dem Index 1.47 empfiehlt zum Einschliessen Giltay (Arch. Néerland. Tome 18 1883 p. 443; Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 136).

443. **Methylsalicylat** nach Guéguen (oben § 126) mit dem Index 1.537 ist nach meinen (Mayer) allerdings nur geringen Erfahrungen ein brauchbares Einschliessmittel; es verändert die Färbungen mit Hämateïnthonerde nicht. Zum Umrahmen des leicht verdunstenden Oeles empfehle ich Apáthys Zuckersyrup (s. § 416).

---

19. Kapitel.

Kitte und Firnisse.

444. Allgemeines. Dank dem Eifer der Dilettanten, speziell der englischen, gibt es in der Literatur eine grosse Menge von Rezepten für Kitte und Firnisse. Indessen sind wohl nur wenige wirklich gut und nützlich, während die meisten lediglich auf die Schönheit der Präparate abzielen, besonders wenn es sich darum handelt, solche für den Verkauf herzustellen.

Ueberflüssig, obwohl hie und da noch im Gebrauch, ist der Verschluss von Präparaten, die in Harz liegen, durch einen besonderen Firniss. Ebenso wenig kommt in der Regel, abgesehen von Präparaten für und von Dilettanten, der luftdichte Abschluss von Alkohol oder Wasser in Frage. Vielmehr wird allermeist von den Kitten und Firnissen nur verlangt, dass sie 1) die Verdunstung des verdünnten Glycerins, Kaliumacetats etc. verhindern oder 2) umgekehrt dem konzentrirten Glycerin nicht gestatten, Wasser aus der Luft anzuziehen, 3) Deckglas und Objekt vor Verschiebungen auf dem Objektträger bewahren. Das setzt natürlich eine ganz innige Adhäsion des Kittes an das Glas voraus, und wenn sich diese auch auf einem absolut trocknen, vorher sorgfältig gereinigten Objektträger leicht von selbst ergibt, so sind damit in der Praxis doch oft bedeutende Schwierigkeiten verbunden.

Auch wenn es gelungen ist, den Kitt fest aufzutragen, so folgt daraus noch keineswegs, dass er für immer haftet. Denn zunächst kommen hier die nicht geringen Temperaturschwankungen in Betracht, denen die Präparate im Laufe des Jahres ausgesetzt sind: sie haben eine Veränderung im Volumen des Glycerins (oder Kaliumacetats etc.) zur Folge, und diese kann unter Umständen den Zusammenhang zwischen Deckglas, Objektträger und Kitt lockern. Bis zu einem gewissen Grade lässt sich dieser Gefahr dadurch begegnen, dass man absichtlich eine Luftblase im Präparat unterbringt, oder dass man

recht dünne Deckgläser nimmt, die sich ein klein wenig aus- oder einbuchten können. In der That finde ich (MAYER) denn auch, dass grosse Präparate hierunter weniger leiden als kleine. Der Kunstgriff mit der Luftblase ist theoretisch jedenfalls gut, nur gelingt es oft beim besten Willen nicht, eine solche von den richtigen Dimensionen in das Präparat einzuschmuggeln.

Ferner ist — und hierauf scheint noch Niemand aufmerksam gemacht zu haben — von grosser Bedeutung die Wirkung des wässerigen Einschliessmediums, besonders des Glycerins, auf die Objekte. Wenn diese im Laufe der Zeit zu quellen beginnen, so hilft auch der beste Kitt nur wenig, sondern bald schon wird das Deckglas vom Kitt oder dieser vom Objektträger abgehoben. Man sollte also das Objekt schon längere Zeit vor dem definitiven Einrahmen mit Glycerin von der gewünschten Stärke sorgfältig durchtränken, nicht aber es direkt aus Alkohol oder Wasser in Glycerin legen und sofort einlacken.

S. im Uebrigen ROUSSELET in: Journ. Quekett Micr. Club (2) Vol. 7 1898 p. 93 und 129.

445. Zähigkeit der Kitte. BEHRENS (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 55) hält den Bernsteinlack für den besten und ist gegen alle, die Chloroform, Benzol, Aether und Alkohol enthalten, da sie alle brüchig werden; besser sind die mit Terpentin oder Leinöl, daher ist ein guter Asphaltlack auch zu empfehlen. — AUBERT (Amer. Month. Micr. Journ. Vol. 6 1885 p. 227; Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 6 1886 p. 173) setzt Millers Kautschukkitt obenan, dann kommt ihm Lovetts Kitt und zuletzt der Zinkweisskitt, der nur $^1/_4$ so zäh sei wie der Kautschukkitt.

Die Formeln für viele Kitte und Firnisse sind zusammengestellt bei AUBERT (* The Microscope Vol. 11 1891 p. 150; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1891 p. 692) und BEHRENS (Tabellen 3. Aufl. 1898 p. 78).

446. Wachszellen. Um das Vordringen des flüssigen Kittes oder Firnisses unter das Deckglas zu verhindern, muss man das Glycerin (oder Kaliumacetat etc.) zuvor nach aussen abschliessen. Dazu dient nach meinen (MAYER) Erfahrungen am besten Paraffin, Wachs oder ein ähnliches hartes Fett. Besonders bequem finde ich dazu die ganz dünnen, langen, gewöhnlich zu Spiralen aufgewundenen Wachskerzen. Von diesen schneidet man ein Stück ab, zündet es an,

bläst es aus und lässt sofort von dem noch heissen Docht auf das Deckglas an allen 4 Ecken je ein Tröpfchen Wachs abfliessen. Sobald diese erstarrt sind, fährt man mit der eventuell von Neuem in einer Flamme erwärmten Kerze an den Rändern des Deckglases entlang und schliesst auf diese Weise das Glycerin ganz ein. Nun kann man vorsichtig das etwa ausgetretene Glycerin mit Fliesspapier und Wasser entfernen und dann den Firniss auftragen.

Bei dicken Objekten thut man gut daran, auf den trockenen Objektträger zuerst in der nämlichen Art mit Wachs einen Rahmen von der Grösse des Deckglases zu ziehen; wenigstens 3 Seiten sollten auch annähernd die nöthige Höhe haben. Erst jetzt bringt man das Objekt mit möglichst wenig Flüssigkeit in diese Zelle, gibt ihm die richtige Lage, legt das Deckglas auf und hält dieses mit einer Nadel oder einem kleinen Gewicht so lange unbeweglich, bis man es durch einige Tröpfchen Wachs auf der Zelle angekittet hat. Zuletzt füllt man von der offenen Seite mit einer Pipette das Glycerin vorsichtig ein und schliesst nun die Zelle ganz.

Um in dieser Weise Präparate sauber herzustellen, bedarf es einiger Praxis, namentlich bei dicken Objekten. S. auch oben p. 10.

Ueber einen brauchbaren Firniss zum definitiven Bestreichen der Wachszelle s. § 454 u. 455.

Eine ähnliche, aber unbequemere Methode mit Paraffin als Verschliessmittel hat Ranvier angegeben (Traité 1. Ed. p. 140). — Welker hat bereits 1856 Wachs verwandt (s. Schacht, Mikroskop Berlin 1862 p. 286). S. auch Rawitz, Leitfaden 2. Aufl. Jena 1895 p. 86.

447. Papierzellen. Nach meiner (Lee) Erfahrung umrahmt man Flüssigkeiten am besten wie folgt. Mit 2 Punzen schlägt man aus Papier Ringe von etwa 1 mm Breite aus, die etwa 1 mm kleiner im Durchmesser sind als das Deckglas. Dann befeuchtet man einen Ring mit dem Einschliessmittel, legt ihn auf den Objektträger an der richtigen Stelle auf, füllt die so gebildete Zelle mit dem Einschliessmittel, legt das Objekt hinein, das Deckglas darauf, füllt den Raum zwischen Papier und Rand des Deckglases mit Glyceringelatine an (das geht bequem auf einem Drehtische) und zieht nun, sobald diese erstarrt ist, einen Ring von Bellschem oder einem anderen Kitt darum. Um ganz sicher zu gehen, kann man natürlich auch die Gelatine nach Marsh behandeln (s. folgenden §).

448. Gelatinekitt nach Marsh (*Section-cutting, 2. Ed. London 1882 p. 104). 15 g von Nelsons opaque gelatin werden in Wasser eingeweicht, wie

gewöhnlich geschmolzen, mit 3 Tropfen Kreosot verrührt und in einem Fläschlein aufgehoben. Der Ring wird damit warm gezogen, und so wie er, was nicht lange dauert, ganz hart und trocken geworden ist, mit einer Lösung von Kaliumbichromat (1 Theil auf 48 Theile Wasser) bepinselt. Am Tageslichte wird die Gelatine unlöslich, und dann mag man Bellschen Kitt herum ziehen. Diese Methode ist besonders gut für Umrahmung von Glycerin-Präparaten.

449. Zuckersyrup nach Apáthy. S. oben § 416.

450. Firniss nach Rousselet (Journ. Quekett Micr. Club (2) Vol. 7 1898 p. 96). Zuerst wird das Deckglas mit einer Lösung von Dammar in Benzol, die auf feuchtem Glase haftet, umzogen; nach dem Trocknen wird das Präparat aussen mit Wasser sorgfältig vom Glycerin befreit, wieder getrocknet, mehrere Male mit Schellack (in starkem Alkohol gelöst) und zuletzt wenigstens 6 Mal ganz dünn mit Goldgrund bepinselt. Oder aber: zuerst Dammar, dann ein Gemisch von diesem und Goldgrund, dann 3 oder 4 Male nur Goldgrund, zuletzt Wards brauner Kitt (Schellackkitt, zu haben bei E. Ward, Oxford Road, Manchester). Jedenfalls recht umständlich.

451. Kitt von Bell. Zusammensetzung unbekannt; nach Aubert (l. c.) wohl eine Lösung von Schellack; zu haben bei J. Bell & Co. in London (Oxford Street 338) oder bei Grübler & Hollborn in Leipzig. Fliesst leicht aus dem Pinsel und erstarrt rasch, ist löslich in Aether oder Chloroform, wird von Cedernöl nicht angegriffen. Für Flüssigkeiten ist es der beste Kitt, den ich (Lee) kenne.

452. Kautschukkitt von Miller. Genauere Zusammensetzung unbekannt. Sehr zäh, trocknet rasch. Lässt sich mit einem Gemisch gleicher Theile von Chloroform und starkem Alkohol verdünnen (Rousselet in: Journ. Quekett Micr. Club (2) Vol. 6 1895 p. 12).

453. Kitt von Clarke. Zu haben bei J. Bolton in Birmingham (Balshall Heath Road 25). Nach Rousselet (l. c.) für spirituöse Flüssigkeiten der beste, aber für wässerige nicht dicht.

454. Asphaltlack. Ohne Zweifel einer der besten Kitte oder Firnisse, wenn er gut ist. Zu haben bei Grübler & Hollborn. — Kitton (*Month. Micr. Journ. London Vol. 11 1874 p. 34) empfiehlt, den Asphalt in Benzol zu lösen und etwas Goldgrund zuzufügen.

455. Maskenlack. Der schwarze Maskenlack N. 3 von Beseler in Berlin, Schützenstr. 66, wurde zuerst von Schacht (Mikroskop, Berlin 1862 p. 282) empfohlen. Zusammensetzung unbekannt, aber wahrscheinlich eine Lösung von Schellack.

Ich (Mayer) besitze noch heute einige intakte Präparate von 1876 und wende den direkt vom Verfertiger bezogenen Lack auch gegenwärtig mit gutem Erfolge an.

456. Goldgrund (Gold size). Ist im Wesentlichen gekochtes Leinöl und daher, wenn es gut ist, zähe, nicht brüchig, also zu empfehlen. Zu haben bei Grübler & Hollborn. Löslich in Terpentinöl.

457. Marineleim. Im Handel zu haben. Nach CARPENTER ist der beste G K 4. Löslich in Aether oder Kalilauge. Dient zum Kitten von Glas auf Glas.

458. Eingedickter Terpentin. PARKER (Amer. Month. Micr. Journ. Vol. 2 1881 p. 229) löst venetianischen Terpentin in so viel Alkohol, dass es eine dünne Flüssigkeit gibt, filtrirt diese und dampft sie im Sandbade auf etwa $^3/_4$ des ursprünglichen Gewichtes ein. Lässt man einen Tropfen der heissen Masse in kaltes Wasser fallen, so muss er beim Herausnehmen ganz hart sein und beim Schlage mit einem spitzen Messer glasig brechen. — CSOKOR (Arch. Mikr. Anat. 21. Bd. 1882 p. 353) verwendet „gewöhnlichen käuflichen verharzten Terpentin", der brüchig und dunkelbraun sein muss, und dem er eventuell, nachdem er ihn geschmolzen hat, etwas verharztes Terpentinöl zufügt, worauf er ihn mehrere Stunden lang auf dem Wasserbade abdunsten lässt. Beide Arten Terpentin dienen zum Verschluss von Glycerin-Präparaten. Man erhitzt das Ende eines Drahtes, das rechtwinklig umgebogen ist (der kurze Schenkel soll so lang wie das Deckglas sein), in der Flamme, stösst es in den Kitt und legt es dann flach auf den Objektträger an den Rand des Deckglases. Ist das überflüssige Glycerin vorher schon sauber weggewischt worden, so legt sich der Kitt glatt an und wird sofort hart. Er soll ganz sicher schliessen und nie unter das Deckglas treten.

459. Terpentin und Wachs nach VOSSELER (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1891 p. 462): Weisses Wachs mit $^1/_2$—$^1/_3$ an venetianischem Terpentin. Sehr geschmeidig.

460. Kolophonium und Wachs nach KRÖNIG (Arch. Mikr. Anat. 27. Bd. 1886 p. 657). Man schmilzt 2 Theile Wachs und 7—9 Theile Kolophonium zusammen, filtrirt das Gemisch und lässt es erkalten. Beim Gebrauch stellt man das Gefäss in heisses Wasser. Der Kitt wird nicht von Wasser, Glycerin oder Kalilauge angegriffen.

461. Paraffin und Kanadabalsam nach APÁTHY (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 171). Gleiche Theile Balsam und Paraffin (von 60° Schmelzpunkt) werden in einer Porzellanschale so lange erhitzt, bis keine Dämpfe von Terpentinöl mehr aufsteigen. Die kalt harte Masse wird beim Gebrauche erwärmt und mit einem Glasstabe oder Messingspatel aufgetragen. Ein Ueberzug genügt. Der Kitt läuft nicht in das Glycerin hinein und springt auch nicht.

462. Bernsteinlack. Wird von BEHRENS (§ 445) wegen seiner grossen Zähigkeit sehr empfohlen, ebenso von AMANN (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 21). Er stammt von E. Pfannenschmidt in Danzig. Zu beziehen durch Grübler und Hollborn.

463. Bernstein- und Kopalfirniss nach Heydenreich (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 338). Darstellung äusserst komplizirt. — Ueber Kopalfirniss s. auch Journ. R. Micr. Soc. London f. 1898 p. 247.

464. Schellackfirniss nach Beale (* How to work etc. p. 28). Von Schellack wird in Alkohol eine dicke Lösung hergestellt. Ein wenig Rizinusöl (20 Tropfen auf 30 ccm) soll ihn verbessern. Er ist unzuverlässig, schützt aber jedenfalls die Balsampräparate vor Cedernöl. — Eine Methode zur Bereitung reinen Schellacks gibt Witt an (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 199). — Schellackkitt für Metall auf Glas s. bei Seaman (Journ. R. Micr. Soc. London f. 1888 p. 520).

465. Siegellack. Nach Ranvier (Traité 1. Ed. p. 140) wird bestes, grob zerkleinertes Siegellack in starkem Alkohol aufgelöst. — Apáthy (Mikrotechnik 1896 p. 174) umrandet die Glycerinpräparate mit einer dicken Lösung von der „allerfeinsten“ Sorte Siegellack in absol. Alkohol.

466. Tolubalsam nach Carnoy (Biol. cellul. p. 129). Tolubalsam 2 Theile, Kanadabalsam 1 Theil, gesättigte Lösung von Schellack in Chloroform 2 Theile werden gemischt und mit Chloroform bis zur Syrupdicke verdünnt. Soll alle anderen Kitte an Güte übertreffen.

---

20. Kapitel.

Injiziren.

467. Allgemeines. Die Massen zum Injiziren bestehen aus der Farbmasse selber und ihrem Vehikel. Nach der Art des letzteren sind in den folgenden Paragraphen die Formeln geordnet worden.

Bei Injektionen der Gefässe von Wirbelthieren hält man sich mit Vortheil an die Praxis von Robin und Ranvier und event. auch an die Vorschriften im Lehrbuch der vergl. mikrosk. Anatomie von Fol. Für Wirbellose (und wenn bei Wirbelthieren ausser den Gefässen auch die Struktur des umgebenden Gewebes studirt werden soll) sind aber Glycerinmassen häufig besser als die Gelatinemassen, die von jenen Autoren hauptsächlich empfohlen werden; als besonders praktisch erscheinen mir (Lee) die Vorschriften von Beale für Berlinerblau und Glycerin (§ 490 u. 491). Ueberhaupt gewähren die Glycerinmassen den grossen Vortheil, dass sie kalt verwendet werden.

Von den Formeln der ganz undurchsichtigen Massen sowie deren, die nur zu gröberen Injektionen (von Leichen etc.) dienen, sind hier absichtlich nur wenige aufgeführt, da sie das mikroskopische Studium der Gefässe nicht mit Vortheil zulassen.

Ueber die sogenannten physiologischen Injektionen mit Ammoniakkarmin, Lakmus, Tusche etc. s. unten § 815.

468. Zum Erschlaffen der Gefässwände höherer Wirbelthiere verwenden Oviatt & Sargent (*St. Louis Med. Journ. 1886 p. 207; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1887 p. 341) Amylnitrit. Man betäubt das Thier mit einem Gemisch von Aether und Amylnitrit und tödtet es dann mit reinem Amylnitrit, oder injizirt nach der Tödtung mit Amylnitrit Normalsalzwasser nebst etwas Amylnitrit und schickt dann die eigentliche Injektionsmasse nach. Auf alle Fälle kann man auch der Masse kurz vor dem Gebrauch ein wenig Amylnitrit zufügen.

Ueber Atropinsulfat oder Milchsäure zum gleichen Zwecke s. unten § 493 und 740 (Hill).

Massen mit Gelatine.

469. Gelatine als Vehikel nach ROBIN (Traité du Microscope Paris 1871 p. 30). Gute Gelatine wird in kaltem Wasser eingeweicht und im Wasserbade verflüssigt; man nehme auf 7—10 Theile Wasser nur 1 Theil Gelatine (gewöhnlich macht man die Massen viel zu dick) und setze ihr dann die Farbmassen (s. unten) zu. Gegen Schimmel nützen auf die Dauer auch Kampher und Karbolsäure nicht, wohl aber nach HOYER Chloralhydrat (s. § 476).

470. Glyceringelatine als Vehikel nach ROBIN (Traité p. 32). In 300 ccm Wasser, worin etwas arsenige Säure gelöst worden ist, löse man 50 g gute Gelatine und setze 150 g Glycerin und einige Tropfen Karbolsäure zu. Diese Masse verdirbt nie. Mit beiden Vehikeln (§ 469 und 470) können die Farbmassen, die in § 472—474 angegeben sind, kombinirt werden.

FRANKL (Zeit. Wiss. Z. 63. Bd. 1897 p. 28) lässt 10—15 Platten Gelatine aufquellen, setzt das gleiche Quantum Glycerin zu, kocht die Masse kurze Zeit, fügt ihr 4—5 g konzentrirte Sublimatlösung zu, giesst sie durch Leinewand, vermischt sie mit einer Lösung von löslichem Berlinerblau (1 : 20) oder von Karmin (1 : 20), erwärmt und filtrirt wieder, senkt in die noch halbflüssige Masse einen Thymolkristall und hebt sie so Jahre lang unverändert auf.

471. Gelatine und Formol. Nach FRIEDENTHAL (Centralbl. Phys. 13. Bd. 1899 p. 267) dient eine 10%ige gefärbte Gelatine, die mit 4%igem Formol zu gleichen Theilen versetzt ist, gleichzeitig zum Injiziren und Härten der Gewebe.

472. Karminmasse nach ROBIN (Traité p. 33). In einem Mörser verreibe man 3 g Karmin mit etwas Wasser und so viel Ammoniak, wie zur Lösung erforderlich ist, setze 50 g Glycerin zu und filtrire. Dann füge man von saurem Glycerin (5 g Essigsäure auf 50 g Glycerin) soviel hinzu, bis eine ganz schwach saure Reaktion eintritt (sehr empfindliches Lakmuspapier, das man anfeuchtet und darüber hält, muss sich röthen). Von dieser Masse setzt man zu den obigen Vehikeln (§ 469 oder 470) 1 Theil auf 3—4 Theile.

473. Ferrocyankupfermasse nach ROBIN (Traité p. 34). Konzentrirte Lösung von gelbem Blutlaugensalz 20 ccm und Glycerin 50 ccm werden gemischt, ebenso konzentrirte Lösung von Kupfervitriol 35 ccm und Glycerin 50 ccm; beide Gemische werden langsam und unter Umrühren zusammengegossen und kurz vor der Injektion mit dem dreifachen Volumen an Vehikel vermischt.

474. Berlinerblaumasse nach ROBIN (Traité p. 35). Konzentrirte Lösung von Ferrocyankalium 90 ccm (im Original steht sulfocyanure

de fer!) und Glycerin 50 ccm werden gemischt, ebenso flüssiges Eisenchlorid von 30 ° Baumé 3 ccm und Glycerin 50 ccm; beide Gemische werden langsam zusammengegossen und mit dem dreifachen Volumen an Vehikel vermischt. Man thut gut daran, einige Tropfen Salzsäure hinzuzufügen.

475. Karmingelatine nach Ranvier (Traité 1. Ed. p. 116). Man weicht 10 g gute Gelatine $^1/_2$ Stunde lang in Wasser ein, bis sie tüchtig gequollen ist, wäscht sie, lässt das Wasser ablaufen und schmilzt sie dann im Wasserbade; dann setzt man unter Umrühren eine Karminlösung hinzu, die man so bereitet, dass man 5 g Karmin mit Wasser anreibt und tropfenweise Ammoniak hinzufügt, bis eine klare Lösung entsteht. Man erhält so, wenn alles ordentlich gemacht ist, etwa 30 ccm rothe Gelatine; noch auf dem Wasserbade neutralisirt man sie, indem man tropfenweise Essigsäure hinzugibt (1 Theil Eisessig und 2 Theile Wasser; nähert man sich der Neutralisation, so nimmt man die Essigsäure schwächer). Sobald der Geruch nach Ammoniak dem nach Säure weicht, hört man mit dem Zusatz der Essigsäure auf und prüft die Masse unter dem Mikroskop: enthält sie Körnchen von Karmin, so taugt sie nichts. Die perfekte Neutralisation lernt man nur durch die Praxis erreichen, und die vorherige Bestimmung der Menge der Säure ist fehlerhaft, weil das Ammoniak nie gleich stark ist, und auch, weil oft die käufliche Gelatine sauer reagirt. — Die ganz neutrale Masse wird durch ungebrauchten Flanell gepresst.

Nach Ville (*Gaz. hebdom. Sc. Méd. Montpellier 1882) wird bei der Lösung von Karmin in Ammoniak ein Theil des letzteren gebunden, also muss nur der Ueberschuss neutralisirt werden. Die Säure in der Gelatine lässt sich durch Auswaschen unter der Wasserleitung etwa 1 Stunde lang, wobei die Gelatine aber ganz unter Wasser bleiben muss, leicht entfernen. Die Neutralität wird besser als durch den Geruch durch empfindliches violettes Lakmuspapier ermittelt: sobald dieses nur noch ganz langsam blau wird, darf man keine Säure mehr zusetzen.

476. Karmingelatine nach Hoyer (Biol. Centralbl. 2. Bd. 1882 p. 21). Zu einer konzentrirten Lösung von Gelatine gebe man die „entsprechende“ Menge von Hoyers konzentrirter neutraler Karminlösung (l. c. p. 17) und halte das Gemisch im Wasserbade so lange warm, bis die dunkelviolette Farbe hellviolett wird. Dann füge man $^1/_{20}$ bis $^1/_{10}$ Volumen Glycerin und wenigstens 2 % Chloralhydrat (in konzentrirter Lösung) hinzu. Nach dem Filtriren durch Flanell kann man die Masse in einem offenen Gefässe unter einer Glasglocke aufbewahren.

477. Karmingelatine nach Fol (Zeit. Wiss. Z. 38. Bd. 1883 p. 492). Sie kann trocken beliebig lange aufbewahrt werden; der Zusatz von Chloralhydrat zur feuchten Masse schützt nach Fol nicht genug.

1 Kilogramm von Simeons Gelatine für Photographen (kann direkt von der Fabrik in Winterthur bezogen werden; die weichere Sorte ist besser; wahrscheinlich eignen sich auch aus anderen Fabriken gute Sorten für Photographen) weicht man in wenig Wasser etwa 2 Stunden lang ein, lässt das Wasser ablaufen, schmilzt die Gelatine auf dem Wasserbade und rührt langsam 1 Liter konzentrirter Lösung von Karmin in Ammoniak darunter. (Zur Lösung verdünnt man 1 Theil starkes Ammoniak mit 3—4 Theilen Wasser, löst darin möglichst viel Karmin und filtrirt direkt vor der Verwendung das ungelöste Karmin ab.) Dann gibt man zu dem Gemisch, das stark nach Ammoniak riecht, in bekannter Weise Essigsäure, bis die Farbe blutroth wird. Genau zu neutralisiren ist nicht nöthig. Die Masse wird nun bei Seite gestellt, bis sie hart ist, und in Stücke geschnitten; diese bindet man in groben Tüll oder ein feines Netz und treibt sie durch kräftiges Drücken mit der Hand unter angesäuertem Wasser ($^1/_{1000}$ Essigsäure, sonst wäscht sich das Karmin heraus; s. Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 4 1884 p. 474) durch die Maschen in Gestalt von feinen Nudeln, die man noch mehrere Stunden lang in einem Siebe unter fliessendes Wasser stellt, um ja jede Spur von Ammoniak oder Säure zu entfernen. Dann schmilzt man die Nudeln wieder, giesst die Masse auf Pergamentpapier, das mit Paraffin getränkt ist, und hängt die Bogen an einem luftigen Orte zum Trocknen auf. Ist sie trocken, so lässt sie sich leicht vom Papier ablösen, in lange Streifen schneiden und, vor Staub und Feuchtigkeit geschützt, aufbewahren. Will man sie verwenden, so braucht man sie nur einige Minuten in Wasser aufzuweichen und im Wasserbade zu schmelzen.

Ohne ein sehr viel schlechteres Resultat kann man den Prozess auch vereinfachen (Fol, Lehrbuch p. 13). In der oben angegebenen Karminlösung weicht man Gelatineplatten 2 Tage lang ein, wäscht sie ab, legt sie auf einige Stunden in das mit Essigsäure angesäuerte Wasser, wäscht sie auf einem Siebe mehrere Stunden lang unter der Wasserleitung, trocknet sie auf dem Pergamentpapier und hebt sie, wie gemeldet, auf.

478. Karmingelatine nach Gerlach (Ranvier, Traité 1. Ed. p. 118); nach Thiersch (Arch. Mikr. Anat. 1. Bd. 1865 p. 148).

479. Berlinerblaugelatine nach Ranvier (Traité 1. Ed. p. 119). Eine konzentrirte Lösung von Eisenoxydsulfat in destill. Wasser wird langsam in eine eben solche von gelbem Blutlaugensalz gegossen, jedoch muss von letzterer ein Ueberschuss bleiben. Man prüft daher, wenn sich das Berlinerblau etwas abgesetzt hat, ob ein weiterer Zusatz der Eisenlösung noch einen Niederschlag gibt. Man filtrirt die Flüssigkeit sammt dem Berlinerblau durch ein Filzsieb, das über

einem Trichter mit einem Filter darin angebracht ist. Zuerst läuft die gelbe Flüssigkeit ab, dann giesst man nach und nach etwas destillirtes Wasser auf das Sieb, und die hiervon ablaufende Flüssigkeit wird immer mehr bläulich; aber man fährt mit dem Zusatz von Wasser so lange fort, bis — nach einigen Tagen — auch durch das Filter blaue Flüssigkeit geht. Dann taucht man das Sieb umgedreht in destillirtes Wasser, worin sich das jetzt löslich gewordene Berlinerblau ganz lösen wird, wenn man genug Wasser genommen hat.

Diese Lösung kann als solche aufbewahrt oder eingedampft und als Pulver aufgehoben werden. Benutzt man sie ohne weiteren Zusatz zum Injiziren, so muss sie konzentrirt sein und geht dann nie durch die Gefässwände hindurch; man kann sie aber auch mit $^1/_4$ Volumen Glycerin oder endlich mit Gelatine versetzt brauchen. Im letzteren Falle nimmt man auf 25 Gewichtstheile des konzentrirten Blaues 1 Gewichtstheil trockene Gelatine.

Die Gelatine löst man wie gewöhnlich (nach dem Aufweichen in Wasser) in ihrem eigenen Wasser durch Erwärmen, bringt die Lösung von Berlinerblau auf dieselbe Temperatur und giesst sie allmählich unter Umrühren mit einem Glasstabe in jene. Das Präzipitat, das zu Anfang immer entsteht, muss bei weiterem Erwärmen verschwinden, sodass der Glasstab beim Herausnehmen aus der Flüssigkeit keine Klümpchen mehr zeigt (ist das nicht der Fall, so taugt die Gelatine nicht). Dann filtrirt man die Masse durch neuen Flanell und hält sie bis zur Injektion auf dem Wasserbade bei 40 ° C.

480. Berlinerblaugelatine nach Brücke (Arch. Mikr. Anat 1. Bd. 1865 p. 87). Man mache a) eine Lösung von gelbem Blutlaugensalz in Wasser, die in 1 Liter 217 g enthält, verdünne b) die käufliche Eisenchloridlösung mit 10 Theilen Wasser, nehme von a und b gleiche Volumina, setze zu jedem 2 Volumina einer kaltgesättigten Lösung von Natriumsulfat und giesse nun unter Umrühren die Eisenlösung in die andere. Dann wasche man auf einem Filter den Niederschlag so lange, bis er blau durchläuft, presse ihn zwischen Filtrirpapier in einer Presse und trockne ihn an der Luft. Vom trocknen Blau mache man eine konzentrirte Lösung und versetze diese mit so viel Gelatine, dass die Masse kalt erstarrt.

481. Berlinerblaugelatine nach Thiersch (Arch. Mikr. Anat. 1. Bd. 1865 p. 148). Man bereite zunächst eine Lösung von 1 Theil Gelatine

in 2 Theilen Wasser, mische dann a) bei reichlich 30 ° C. (25 ° R.) 2 ccm einer konzentrirten Lösung von Eisenvitriol mit 5 ccm dieser flüssigen Gelatine, desgleichen b) 4 ccm einer konzentrirten Lösung von rothem Blutlaugensalz mit 10 ccm der Gelatine und gebe nun zu dieser erst 4 ccm einer konzentr. Lösung von Oxalsäure, dann aber unter Umrühren das Gemisch a und rühre fortwährend bei einer Wärme von 25—30 ° C. um, bis alles Berlinerblau entstanden ist. Endlich erwärme man die ganze Masse auf dem Wasserbade bis auf etwa 90 ° C. und giesse sie durch Flanell.

482. Berlinerblaugelatine nach Fol (Zeit. Wiss. Z. 38. Bd. 1883 p. 494). Eine Modifikation der Vorschrift von Thiersch (s. vorigen §). Die fertige Masse wird ähnlich wie bei der Karminmasse von Fol (oben § 477) gewaschen, getrocknet und in Streifen geschnitten.

483. Silbergelatine nach Hoyer (Biol. Centralbl. 2. Bd. 1882 p. 19). Eine konzentrirte Lösung von Gelatine versetze man mit dem gleichen Volumen einer 4%igen wässerigen Lösung von Höllenstein, erwärme die Masse und füge ein wenig Pyrogallussäure in Wasser gelöst hinzu. Das Silber wird fast augenblicklich reduzirt; dann setzt man Glycerin und Chloralhydrat hinzu wie bei der Karminmasse (§ 476). Die Masse erscheint in den Kapillaren gelb, in den grösseren Gefässen braun, und die Farbe ist haltbar.

484. Silbergelatine nach Ranvier zu Imprägnationen (Traité 1. Ed. p. 123). Konzentrirte Lösung von Gelatine 2—4 Theile, 1%ige Lösung von Höllenstein 1 Theil.

Eine komplizirtere Formel gibt Fol (Zeit. Wiss. Z. 38. Bd. 1883 p. 494) an.

485. Andere Massen. Grüne Masse nach Robin (Traité p. 37; ist Schweinfurter Grün); nach Hoyer (Biol. Centralbl. 2. Bd. 1882 p. 16; durch Mischen einer blauen und einer gelben erhalten); nach Thiersch (Arch. Mikr. Anat. 1. Bd. 1865 p. 149; ebenso). Gelbe Masse (Bleichromat) nach Robin (Traité p. 36); nach Thiersch (Arch. Mikr. Anat. 1. Bd. 1865 p. 149); nach Hoyer (ibid. 3. Bd. 1867 p. 136); nach Fol (Lehrbuch p. 15). Blaue Masse nach Guignet (*Journ. Microgr. Paris Tome 13 1889 p. 94); nach Hoyer (Arch. Mikr. Anat. 12. Bd. 1876 p. 649). Weisse Masse nach Harting (Mikroskop Braunschweig 1866 2. Theil p. 129; ist Bleikarbonat); nach Frey (ibid. p. 130; ist Baryumsulfat). Purpurne Masse nach Miller (Amer. Month. Micr. Journ. Vol. 9 1888 p. 50; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 361).

Kalte Massen mit Gummi, Glycerin etc.

486. Metagelatine als Vehikel nach Fol (Lehrbuch p. 17). Um das lästige Erwärmen der Gelatine beim Injiziren zu umgehen, verwendet Fol Metagelatine, die auch kalt flüssig bleibt. Man gewinnt sie durch mehrstündiges Erwärmen der Gelatinelösung mit etwas Ammoniak. Man kann ihr die Farbstoffe direkt zusetzen oder sie auch mit schwachem Alkohol verdünnen. Die injizirten Gewebe bringt man in starken Alkohol oder Chromsäurelösung, wodurch die Masse hart wird.

487. Karmin und Eiweiss nach Joseph (57. Jahresb. Schles. Ges. Vaterl. Cultur 1880 p. 198). Filtrirtes Eiweiss wird mit 1 bis 5 % Karminlösung versetzt. Die Masse koagulirt durch verdünnte Salpetersäure, Chromsäure oder Osmiumsäure und bleibt in den Capillaren durchsichtig. Sie dient zur Injektion von Invertebraten.

488. Gummi arabicum nach Bjeloussow (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1885 p. 379). Man nehme 1 Theil Borax, löse ihn in möglichst wenig Wasser, löse ferner 2 Theile Gummi arab. in Wasser zu einem Syrup, mische beide Flüssigkeiten, reibe die durchsichtige, fast unlösliche Masse nach und nach mit gewöhnlichem Wasser an und drücke sie durch feine Leinwand. Man wiederhole Verreiben und Durchpressen, bis man eine Masse ganz ohne Klümpchen erhält. (Ist sie gut gerathen, so muss sie in Alkohol erstarren, aber dabei auf das Doppelte anschwellen.) Diese Masse lässt sich mit allen trockenen Mineralfarben mischen mit Ausnahme von Cadmium- und Kobaltfarben. Nach der Injektion legt man die Präparate in Alkohol, worin, wie gesagt, die Gefässe stark anschwellen und zugleich hart werden. Kaltblüter kann man noch lebend damit injiziren. Aus den angeschnittenen Gefässen fliesst die Masse nicht aus; die Präparate halten sich in Alkohol und lassen sich mit Glycerin durchsichtig machen. Will man dagegen die Masse aus einem Gefässe wegschaffen, so braucht man nur verdünnte Essigsäure anzuwenden, die sie auflöst.

489. Karmin mit Glycerin nach Beale (*How to work, p. 95). Man löst 0,3 g Karmin in ein wenig Wasser mit 5 Tropfen Ammoniak, giesst es in 15 g Glycerin und setzt dann allmählich unter Umrühren 15 g Glycerin nebst 8—10 Tropfen Essig- oder Salzsäure (Stärke nicht angegeben) hinzu. Das Gemisch muss blaues Lakmuspapier entschieden röthen (eventuell noch etwas Säure zusetzen!); man gibt zum Schluss 15 g Glycerin, 8 g Alkohol und 24 g Wasser hinzu.

490. Berlinerblau mit Glycerin nach Beale (ibid. p. 93). Man mischt 120 g Wasser mit 30 g Glycerin, löst dann in 30 g dieses Gemisches 0,7 g gelbes Blutlaugensalz, ferner in 30 g 3¾ g Tinct. ferri sesquichlorati, setzt letztere Lösung ganz allmählich unter Umschütteln zu ersterer und fügt ebenfalls langsam unter Schütteln den Rest des Wassers und Glycerins sowie

30 g Alkohol von 95% hinzu. Die injizirten Präparate sind in Glycerin mit 1% Essigsäure aufzuheben, damit das Blau nicht vergehe.

491. **Saure Masse** nach BEALE (ibid. p. 296). Aehnlich der vorigen zu bereiten aus Glycerin 60 ccm, Wasser 30 ccm, Tinct. ferri sesquichl. 10 Tropfen, gelbem Blutlaugensalz 0,2 g, starker Salzsäure 3 Tropfen. Man kann zum Schluss 8 g Alkohol zusetzen. Das Gemisch dringt nach meinen (LEE) Erfahrungen gut ein und fliesst aus angeschnittenen Capillaren nicht so leicht aus, wie man glauben möchte; auch hält es sich Jahre lang ganz unverändert.

492. **Berlinerblau und Glycerin** nach RANVIER (Traité p. 120). Lösliches Berlinerblau (§ 479) mit 1/4 Glycerin gemischt.

493. **Indigkarmin** nach THOMA (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. 1899 p. 270): in 50 ccm Wasser löst man 0,15 g Natriumindigsulfat, filtrirt, fügt erst 40 ccm Glycerin und dann unter Umrühren allmählich 10 ccm einer 20%igen filtrirten Lösung von Chlornatrium in Wasser (eventuell auch 3 ccm einer 1%igen Lösung von Atropinsulfat zur Erweiterung der Arterien) hinzu. Es entsteht ein feinkörniges Präzipitat, das sammt der Flüssigkeit injizirt wird.

494. **Gummigutt mit Glycerin** nach HARTING (Mikroskop, Braunschweig 1866 2. Theil p. 124). Man reibt ein Stück Gummigutt auf einem Teller ab und vermischt diese Farbe mit Glycerin; oder zu einem Gemisch gleicher Theile von Wasser und Glycerin setzt man so viel gesättigte alkoholische Lösung von Gummigutt, dass die Flüssigkeit beim Umschütteln tief gelb wird. Das äusserst fein präzipitirte Gummigutt bleibt suspendirt. Einen etwaigen Ueberschuss an Alkohol schafft man dadurch weg, dass man die Masse in einer offenen Schale 24 Stunden stehen lässt.

Rein wässerige Massen.

495. **Lösliches Berlinerblau.** Nach CHABRY (Journ. Anat. Phys. Paris 18. Année 1882 p. 503) lösen sich in Wasser etwa 2% der trockenen Verbindung. Auch in 60%igem Alkohol ist sie löslich.

HARRIS (Proc. R. Soc. Edinburgh Vol. 21 1897 p. 383) führt das temporäre Verblassen des injizirten Berlinerblaus auf Reduktion durch Mangel an Sauerstoff im Organismus zurück.

496. **Lösliches Berlinerblau** nach RANVIER (Traité, 1. Ed. p. 120). S. § 479. Es extravasirt nicht.

497. **Berliner Blau** nach MÜLLER (Feinerer Bau der Milz, Leipzig 1865 p. 6 u. 14). Zu 1 Volumen einer konzentrirten Lösung

von löslichem Berlinerblau fügt man $^1/_2$—1 Volumen 90 % igen Alkohols; man injizirt die Flüssigkeit sammt dem sehr feinen, sich nur schwer absetzenden Präzipitate.

498. Lösliches Berlinerblau nach MAYER (Mitth. Z. Stat. Neapel 8. Bd. 1888 p. 310). Man mische 10 ccm Liq. ferri sesquichlorati mit 500 ccm Wasser, gebe dies zu einer Lösung von 20 g gelbem Blutlaugensalz in 500 ccm Wasser, lasse 12 Stunden lang absetzen, giesse die Flüssigkeit ab, wasche das Präzipitat auf einem Filter so lange mit destillirtem Wasser, bis dieses dunkelblau durchläuft (1 bis 2 Tage lang), und löse das Blau in etwa 1 Liter Wasser auf.

Da das Berlinerblau gegen Alkali höchst empfindlich ist, so thut man in allen irgendwie zweifelhaften Fällen gut daran, der Lösung etwas Essigsäure zuzusetzen. Man kann auch mit dem feinen Präzipitat injiziren, das man durch Vermischen der Lösung mit etwa der gleichen Menge 10 % iger Kochsalzlösung erhält.

Aus grösseren Gefässen läuft natürlich das meiste Blau wieder aus, wenn man sie nicht zugestopft (z. B. mit einem Glasconus) hat, aber stets bleibt an den Wandungen genug haften. Die injizirten Objekte bringt man entweder direkt in Alkohol oder auch in wässerige oder alkoholische Fixirgemische, die aber sauer reagiren müssen. Auch eine Kontrastfärbung der Gewebe in toto oder auf Schnitten ist zulässig, z. B. mit einer alkoholischen Karminlösung und Pikrinsäure in Alkohol.

499. Karmin nach EMERY (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 21). Zu einer 10 % igen ammoniakalischen Lösung von Karmin wird unter Umrühren so lange Essigsäure zugesetzt, bis durch das ausfallende Karmin die Farbe der Flüssigkeit heller wird. Man giesst letztere von dem geringen Präzipitate ab, injizirt sie kalt und legt die Objekte (Fische) sofort in starken Alkohol, damit das Karmin rasch ausfalle. Gewöhnlich sind die Gefässe prall genug gefüllt. Sollen die Kapillaren nicht injizirt werden, so setzt man zur Karminlösung so viel Essigsäure, dass das Karmin zum Theil ausgefällt wird, schüttelt vor dem Injiziren die Flasche tüchtig und lässt dann nur einige Minuten lang absetzen, damit die gröbsten Körner nicht mit in die Spritze gelangen. In den Kapillaren bleibt viel von dem feinen Sediment stecken, und so werden die Venen viel heller roth als die Arterien.

500. Tusche nach TAGUCHI (Arch. Mikr. Anat. 31. Bd. 1888 p. 565). Chinesische, besser noch japanische Tusche wird auf einem Abziehstein so lange gerieben, bis die Flüssigkeit, auf dünnes Filtrirpapier getropft, nicht mehr verläuft oder keine grauen Ringe um die Tropfen gibt. Man injizirt so viel, dass die Präparate ganz schwarz aussehen, und legt sie dann in irgend ein Härtgemisch (nicht in reines Wasser.)

GROSSER (Zeit. Wiss. Mikr. 17. Bd. 1900 p. 178) nimmt für kleine Wirbelthiere Tusche, mit filtrirtem Hühnereiweiss angerieben. — S. auch HOCHSTETTER (Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1898 p. 186: Füllung von Hohlräumen mit Tusche oder Luft).

Celloidinmassen und andere Massen.

501. Celloidinmasse nach SCHIEFFERDECKER (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1882 p. 201). Für Corrosionspräparate. S. die früheren englischen Auflagen dieses Buches oder Whitman, Methods.

Nach HOCHSTETTER (Anat. Anzeiger 1. Jahrg. 1886 p. 51).

502. Asphaltmasse nach BUDGE (Arch. Mikr. Anat. 14. Bd. 1870 p. 70: Asphalt in Benzol gelöst).

503. Schellackmasse nach HOYER (Arch. Mikr. Anat. 13. Bd. 1877 p. 645); s. auch BELLARMINOW (Anat. Anzeiger 3. Jahrg. 1888 p. 650).

504. Oelfarben nach HOYER (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 4. Bd. 1887 p. 346; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 80); nach GEROTA (Anat. Anzeiger 12. Bd. 1896 p. 219; s. auch BRUHNS in: Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. 1898 p. 60).

505. Stärke nach PANSCH (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1877 p. 480, f. 1880 p. 232, 371, f. 1881 p. 76, f. 1882 p. 60, f. 1883 p. 265; s. auch GAGE in: Journ. R. Micr. Soc. London f. 1888 p. 1056).

506. Leinölkitt nach TEICHMANN; ist nach HOYER (Verh. Anat. Ges. 9. Vers. 1895 p. 77) im Wesentlichen gekochtes Leinöl mit Kreide und Zinnober oder mit Zinkoxyd und Ultramarinblau; zum Verdünnen dient Schwefelkohlenstoff oder Aether oder (s. TICHANOFF in: Internation. Monatschr. 15. Bd. 1898 p. 356) Benzin.

507. Natürliche Injektionen (ROBIN, Traité p. 6). Um diese zu konserviren, lege man die Organe in ein Gemisch von 1 Theil Liq. ferri sesquichlorati und 10 Theilen Wasser.

RETTERER (Journ. Anat. Phys. Paris 24 Année 1888 p. 324; ibid. 30. Année 1894 p. 336) und ZENKER (Arch. Path. Anat. 135. Bd. 1894 p. 147) verwenden zum gleichen Zweck Müllers Gemisch 24 Stunden lang; Zenker färbt, um das Blut recht deutlich zu machen, die Präparate mit Biondis Gemisch.

S. auch TRZASKA in: Arch. Path. Anat. 153. Bd. 1898 p. 110.

---

21. Kapitel.

Maceriren und Verdauen.

Maceriren.

508. Methoden zur Dissociation. Mitunter ist es zur genauen Kenntniss der Elemente eines Gewebes nothwendig, diese aus ihrer Lage im Gewebe loszulösen und nach der Trennung von ihren Nachbarn und von den etwa vorhandenen interstitiellen Kittsubstanzen für sich zu studiren. Häufig genügt hierzu das einfache Zerzupfen mit Nadeln nicht, denn der Kitt ist oft zäher als die Elemente selber, und so werden diese hierbei zerrissen und zerstört. Alsdann muss man zur Maceration greifen, d. h. zur Behandlung mit Mitteln, die den Kitt oder die Elemente, die man nicht studiren will, auflösen oder wenigstens erweichen, zugleich aber die Form der Elemente, die man isolirt haben möchte, konserviren. Sind jene gut erweicht, so beendet man die Isolirung entweder durch Zerzupfen oder durch Schütteln in einem Reagensglase mit etwas Flüssigkeit, oder durch Klopfen — und gerade letzteres giebt häufig, z. B. bei manchen Epithelien, so gute Resultate, wie sie sich auf keine andere Art erreichen lassen. Man bringt nämlich das macerirte Gewebe auf einen Objektträger, legt ein Deckglas darauf, das man an allen 4 Ecken durch sogenannte Wachsfüsse, d. h. Kügelchen von weichem Wachs, unterstützt, und klopft nun mit einer Nadel sanft auf dem Deckglas umher, sodass dieses allmählich heruntergedrückt wird und die Zellen des Gewebes auseinander drängt. Ist dies zur Genüge geschehen, so setzt man das Einschlussmedium zu und umrahmt das Präparat. S. auch § 196.

Man vernachlässige diese einfache Methode, die doch eine der wichtigsten ist, ja nicht. Das Material zu den Wachsfüssen macht man sich nach VOSSELER (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1891 p. 461) durch Schmelzen von weissem Wachs und Hineinrühren von $^1/_2$—$^2/_3$ seines Gewichtes an venetianischem Terpentin.

509. Jodserum. Seine Zubereitung s. in § 387. Zur Maceration darin legt man ein Stückchen des Gewebes, kleiner als eine Erbse, in ein gut geschlossenes Gefäss mit 4—5 ccm Serum, das nur schwach mit Jod versetzt ist. Gewöhnlich kann man schon nach 24 Stunden mit Erfolg zerzupfen oder zerklopfen (s. § 508); falls nicht, so muss man länger maceriren, dann aber auch jedesmal etwas Jod zusetzen, so oft wie das Serum (in Folge der Absorption des Jods durch die Gewebe) blass wird. Bei dieser Vorsicht kann man die Maceration einige Wochen lang fortsetzen.

Es versteht sich von selbst, dass diese Methode nur auf frische Gewebe passt, wobei das Jod durch schwaches Härten des Protoplasmas als Fixirmittel wirkt.

Mit künstlichem Jodserum (§ 389) hat RANVIER (Traité 1. Ed. p. 77) beim Maceriren keinen Erfolg gehabt.

510. Jodjodkalium nach ARNOLD (Arch. Mikr. Anat. 52. Bd. 1898 p. 135 u. 763): 10 ccm 10%ige wässerige Jodkaliumlösung werden mit 5—10 Tropfen derselben Lösung, die ausserdem 5% Jod enthält, versetzt. Zur Isolirung von allerlei Zellen und Darstellung der „Granula“ darin.

511. Alkohol. Ranvier (TRAITÉ 1. Ed. p. 241) verwendet den sogenannten Drittelalkohol, d. h. Alkohol von 90% 1 Theil mit 2 Theilen Wasser verdünnt, der nach ihm rascher wirkt als Jodserum. Epithelien maceriren in 24 Stunden völlig darin. Man kann auch stärkeren Alkohol (gleiche Theile von Alkohol und Wasser) oder schwächeren (1/4 Alkohol, z. B. zur Isolirung der Fasern in der Retina nach THIN in: Journ. Anat. Phys. London Vol. 13 1879 p. 139) anwenden, indessen ist im Allgemeinen der Drittelalkohol vorzuziehen. LIST (Zeit Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 511) will ihn allerdings für Drüsen nur mit Vorsicht angewandt wissen, da er in den Zellen Quellungen hervorrufe; hier wirke Müllers Gemisch oder Osmiumsäure besser.

Zum Maceriren von Gefässen nimmt RANVIER (Arch. Phys. Paris (2) Tome 1 1874 p. 789) statt des Wassers im Drittelalkohol eine 1%ige Lösung von Kochsalz, weil sich dann das Blut besser hält. — S. auch § 530 u. 531.

512. Salzlösung. Gut bekannt und werthvoll ist die 10%ige Lösung von Kochsalz.

E. BALLOWITZ (Zeit. Wiss. Z. 50. Bd. 1890 p. 329) fixirt die Spermatozoen mit Dämpfen von Osmiumsäure, macerirt sie entweder nachher oder auch frisch in Kochsalzlösung (0,8—10%) und färbt sie mit Gentianaviolett. S. auch K. BALLOWITZ in: Internation. Monatschr. Anat. Phys. 11. Bd. 1894 p. 218 und E. BALLOWITZ ibid. p. 245.

513. **Kochsalz und Alkohol** nach MOLESCHOTT & BOEHME (* Unters. z. Naturl. 11. Bd. 1872 p. 99; Ranvier, Traité 1. Éd. p. 242): 5 Volumina der 10%igen Lösung von Kochsalz mit 1 Volumen absoluten Alkohols gemischt. Für Flimmerepithel ist dies Gemisch nach Ranvier nicht so gut wie der Drittelalkohol. — S. auch § 511.

514. **Natriumnitrat** nach LOTT (* Unters. Phys. Inst. Graz 3. Heft 1868 p. 268). 10%ige wässerige Lösung zum Isoliren des Epithels, das nachher ohne Weiteres versilbert werden kann. Daher besser als Kochsalzlösung.

515. **Formaldehyd** nach GAGE (Proc. Amer. Micr. Ass. Vol. 17 1896 p. 328). 1000 Theile Normalsalzwasser und 2 Theile Formol sollen rasch wirken und doch die Zersetzung einige Zeit verhindern. — Ueber Acetonchloroform s. oben p. 15 § 20.

516. **Chloralhydrat.** In etwa 2—5 %iger Lösung macerirt es milde und konservirt dabei zarte Gewebe sehr gut. LAVDOWSKY (Arch. Mikr. Anat. 13. Bd. 1877 p. 359) empfiehlt es für glatte Muskeln, HICKSON (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 25 1885 p. 244) für die Retina der Arthropoden, BUTZKE (*Arch. Psychiatrie 3. Bd. 1872) für das Gehirn, besonders nach Fixirung der Elemente durch $^1/_4$%ige Osmiumsäure. — TRINKLER (Arch. Mikr. Anat. 24. Bd. 1884 p. 175) nimmt gleiche Theile einer 5%igen Lösung von Chloralhydrat und einer $^1/_{50}$%igen von Chromsäure nebst etwas Essigsäure.

517. **Kali- oder Natronlauge.** Beide Lösungen müssen nach MOLESCHOTT stark sein, nämlich 35—50 %, um die Form der Zellen nur wenig zu verändern (nach SCHULTZE Kalilauge 28—40 %, Natronlauge 20—22 %); schwach hingegen zerstören sie alle Zellen. (Immerhin lassen sich die schwachen zum Dissociiren der Zellen der Epidermis, Haare und Nägel gebrauchen.) Mit den starken Lösungen behandelt man einfach die Gewebe auf dem Objektträger, und will man daraus Dauerpräparate gewinnen, so neutralisirt man die Kalilauge mit Essigsäure, die damit das wohlbekannte Einschliessmittel Kaliumacetat bildet (BEHRENS, KOSSEL & SCHIEFFERDECKER, Das Mikroskop, 1. Bd. 1889 p. 156).

Oder man setzt statt der Essigsäure direkt 60%ige Lösung von Kaliumacetat (auch wohl noch mit 1% Essigsäure vermischt) in reichlicher Menge zu und schliesst die Präparate entweder hierin oder in Glycerin oder Glyceringelatine ein, kann sie auch färben, wenn man das Kaliumacetat durch 24stündige Behandlung mit Alaunlösung entfernt hat (GAGE in: Proc. Amer. Ass. Micr. Vol. 11 1889 p. 36; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 349).

518. **Baryt- oder Kalkwasser** nach Fol (Lehrbuch p. 110). Ersteres soll bereits in einigen Stunden den Zerfall der Nerven, Muskeln und Bindesubstanzen in Fibrillen bewirken, letzteres erst in Tagen. — Ueber **Ammoniak- oder Natriumkarbonat** für Hornsubstanzen s. unten § 648.

519. **Sulfocyanammonium** oder **-kalium** nach Stirling (Journ. Anat. Phys. London Vol. 17 1883 p. 208). Eine 10%ige Lösung 24—48 Stunden lang für Epithel. — Soulier (Trav. Inst. Z. Montpellier (2) Tome 2 1891 p. 171) hat dagegen gute Resultate nur durch Mischen mit einem Fixirmittel erhalten, besonders mit dem Gemisch von Ripart & Petit, aber auch mit Sublimat, Müllerschem Gemisch etc. Andererseits wirke das Gemisch von Ripart & Petit gut im Verein mit dem künstlichen Serum von Kronecker oder mit Pepsin, Eau de Javelle, 10%iger Lösung von Natriumsulfat oder $1\frac{1}{2}$%iger Natronlauge. Ueberhaupt gelange man durch richtiges Kombiniren eines Macerirgemisches, z. B. der Kochsalzlösungen, der Kali- oder Natronlauge etc., mit den gebräuchlichen Fixirmitteln stets zu einem „wirksamen Dissociirgemisch".

520. **Ammoniummolybdänat** nach Krause (Internation. Monatschr. Anat. Hist. 1. Bd. 1884 p. 153): 5%ige wässerige Lösung für Speicheldrüsen, Retina etc.

521. **Künstlicher Speichel** nach Calberla (Arch. Mikr. Anat. 11. Bd. 1875 p. 449) für embryonale Muskeln und Nerven. Man löse 4 g Chlorkalium, 8 g Chlornatrium, je 2 g Natriumphosphat und Chlorcalcium in 1 Liter Wasser, sättige die Flüssigkeit mit Kohlensäure und verdünne sie mit 1 Liter Wasser und $\frac{1}{2}$ Liter Müllerschem Gemisch (oder $2\frac{1}{2}$%iger Lösung von neutralem Ammoniumchromat). Am besten sättigt man mit der Kohlensäure kurz vor dem Gebrauche. Die Gewebe zerzupft und zerschüttelt man im Speichel und schliesst sie in Kaliumacetat ein.

522. **Ammoniumchromat** nach Landois (Arch. Mikr. Anat. 25. Bd. 1885 p. 445). Von gesättigter Lösung von neutralem Ammoniumchromat, von Kaliumphosphat und von Natriumsulfat je 5 Theile, destillirtes Wasser 100 Theile. Man macerirt darin kleine Stücke 1—3, sogar 4—5 Tage und legt sie darauf in ein Gemisch gleicher Theile von Ammoniakkarmin und obigem Gemisch.

Gierke empfiehlt es für jegliches Gewebe, speciell aber für das Centralnervensystem, wofür es besser sei als irgend ein anderes Reagens. Auch Nansen (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 242) empfiehlt es dafür. Mir (Mayer) hat es sich für Wirbelthiere ebenfalls öfter sehr dienlich erwiesen.

523. **Kaliumbichromat.** In Lösung von $\frac{1}{500}$. — Eisig (Fauna Flora Golf. Neapel 16. Monogr. 1887 p. 297) macerirt die Capitelliden hauptsächlich in $\frac{1}{2}$—1 %iger Lösung von Kaliumbichromat Monate,

selbst Jahre lang (gegen Schimmel Thymol!) und rühmt dieses Mittel sehr. Er zerzupft die Gewebe in der Lösung, wäscht diese unter dem Deckglas mit $^1/_2$ Glycerin und $^1/_2$ Wasser aus, färbt mit Eosin und schliesst in Glycerin oder das Gemisch von Farrants ein.

Brock (Internation. Monatschr. Anat. Hist. 1. Bd. 1884 p. 349) nimmt für das Nervensystem von Mollusken gleiche Theile einer 10 $^0/_0$ igen Lösung von Kaliumbichromat und Blut des Thieres, Möbius (Morph. Jahrb. 12. Bd. 1887 p. 174) für Muscheln aus der Ostsee ein Gemisch aus 1 Theil Ostseewasser und 4—6 Theilen einer $^1/_2$ $^0/_0$ igen Lösung von Kaliumbichromat.

524. Müllers Gemisch. Auf $^1/_{10}$ verdünnt. — Apáthy (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 49) macerirt *Ascaris* zur Isolirung der Muskeln in unverdünntem Müllerschem Gemisch Monate lang. S. auch § 521.

525. Chromsäure. Gewöhnlich als Lösung von 1: 5000 verwandt (M. Schultze 1856); besonders gut für Nerven und glatte Muskeln. Für Nerven genügen 24 Stunden; man nimmt auf ein Stück Gewebe von 5 mm Seite etwa 10 ccm Lösung (Ranvier). — S. auch § 516.

526. Osmiumsäure. Prenant (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 4. Bd. 1887 p. 362; ibid. 9. Bd. 1892 p. 28) verwendet sie zum Maceriren von Hoden und Cochlea: erst 1 $^0/_0$ ige Lösung 12 Stunden lang, dann $^1/_5$ $^0/_0$ ige 2—14 Tage oder $^1/_{10}$ $^0/_0$ ige 4—5 Tage lang.

527. Osmiumsäure und Essigsäure nach Hertwig (Nervensyst. etc. Medusen Leipzig 1878 p. 5; Jena. Zeit. Naturw. 13. Bd. 1879 p. 462). Gleiche Theile einer $^1/_{20}$ $^0/_0$ igen Osmiumsäure und einer $^1/_5$ $^0/_0$ igen Essigsäure. Die Medusen werden auf 2—3 Minuten hineingelegt, dann mit $^1/_{10}$ $^0/_0$ iger Essigsäure zur Entfernung der Osmiumsäure gewaschen, auch 1 Tag lang darin gelassen, in Beales Karmin gefärbt und in Glycerin aufbewahrt. Für Aktinien nimmt man nur $^1/_{25}$ $^0/_0$ ige Osmiumsäure und löst diese sowie die Essigsäure in Seewasser, wäscht ferner in $^1/_5$ $^0/_0$ iger Essigsäure aus. Ist die Maceration beendet, so färbt man mit Pikrokarmin, sonst mit Beales Karmin.

528. Chromosmiumessigsäure. Möbius (Morph. Jahrb. 12. Bd. 1887 p. 174) löst ihre Bestandtheile, also $^1/_4$ $^0/_0$ Chromsäure, $^1/_{10}$ $^0/_0$ Osmiumsäure, $^1/_{10}$ $^0/_0$ Essigsäure, in Ostseewasser und macerirt darin Muscheln aus der Ostsee (also aus salzarmen Seewasser) mehrere Tage.

529. Essigsäure nach Haller (Morph. Jahrb. 11. Bd. 1886 p. 321). 1 Theil Eisessig, 1 Theil Glycerin, 2 Theile Wasser. Soll besonders gut für das Nervensystem der rhipidoglossen Schnecken sein; 30—40 Minuten genügen.

530. Pikrinsäure und Alkohol nach Gage (Proc. Amer. Soc. Micr. Vol. 12 1890 p. 122; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 87). 250 Theile Alkohol von 95%, 750 Theile Wasser, 1 Theil Pikrinsäure. Besonders gut für Epithelien und Muskeln. Einige Stunden genügen. Wird auch von Hopkins (ibid. p. 167) gerühmt.

531. Salicylsäure nach Froriep (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. 1878 p. 422). Eine etwas komplizirte Methode zur Isolirung von quergestreiften Muskeln: erst Einlegen in eine alkoholische, dann Kochen in einer wässerigen Lösung etc.

532. Gerbsäure nach Motta-Coco & Ferlito (Monit. Z. Ital. Anno 10 1899 p. 78) für Muskeln von *Rana*: 24—48 Stunden in $1\frac{1}{2}$%iger wässeriger Lösung.

533. Oxalsäure nach Schultze (Abh. Nat. Ges. Halle 7. Bd. 1863 p. 89). In ganz oder halb konzentrirter Lösung zur Maceration der Nasenschleimhaut von Wirbelthieren, um die Nervenenden zu isoliren.

534. Arsenige Säure. Thiem (*Dissert. Greifswald 1876) verwendet eine gesättigte Lösung zum Isoliren der quergestreiften Muskelfibrillen. Hierzu dient auch gut eine $2\frac{1}{2}$—5%ige Lösung von Ferrosulfat.

535. Kaliumhypermanganat. Es wirkt ähnlich der Osmiumsäure, aber energischer. Allein oder mit Alaun soll es die Fasern der Cornea am besten dissociiren (Rollett in: Strickers Handbuch p. 1108).

536. Salpetersäure. Die 20%ige Säure ist sehr gut für Muskeln. Nach 24 Stunden schüttelt man das Objekt mit Wasser in einem Reagensglase und findet dann bereits die Fasern isolirt. Nachher wäscht man die Präparate mit Wasser aus und kann sie in starker Alaunlösung lange Zeit aufbewahren (Gage in: Proc. Amer. Soc. Micr. Vol. 11 1889 p. 38; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 86). S. auch § 666. Die Maceration geht in der Wärme viel rascher vor sich, bei 40—50° C. genügt oft schon 1 Stunde (Gage).

Ein Gemisch gleicher Theile von Salpetersäure, Glycerin und Wasser braucht Marcacci (Arch. Ital. Biol. Tome 4 1883 p. 293) für glatte Muskeln. Es wird von Hendrickson (Bull. J. Hopkins Hosp. Baltimore Vol. 9 1898 p. 225) gerühmt.

Ueber Salpetersäure oder **Salzsäure** für Nerven s. § 886.

537. Salpetersäure und Kaliumchlorat (KÜHNE, Ueber die peripher. Endorgane Leipzig 1862 p. 6; RANVIER, Traité 1. Ed. p. 79). Etwas Kaliumchlorat übergiesst man in einem Uhrglase mit dem 4fachen Volumen Salpetersäure, begräbt ein Stückchen Muskel darin auf $^1/_2$ Stunde und schüttelt es dann mit Wasser in einem Reagensglase, um die Fasern ganz zu isoliren.

538. Salpetersäure und Essigsäure nach APÁTHY (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 49). 3 Volumtheile Eisessig, 3 Salpetersäure, je 20 Wasser, Glycerin und absol. Alkohol. Blutegel werden darin 24 Stunden lang macerirt und dann direkt in 70 %igen Alkohol gebracht, worin sie aufquellen; nach 24 Stunden in 50 %iges Glycerin, das so oft gewechselt wird, wie es noch sauer reagirt. So lassen sich die Nerven vom Bauchstrang bis zur Haut im Zusammenhang isoliren. (S. auch APÁTHY in: Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1897 p. 728.)

539. Schwefelsäure. In 0,6 %iger Lösung von SCHULTZE (Abh. Nat. Ges. Halle 7. Bd. 1863 p. 90) zum Studium der Nasenschleimhaut empfohlen: 3—4 (aber auch 1—10) Tropfen konzentrirter Schwefelsäure auf 30 ccm Wasser. Auch für die Fasern der Kristalllinse, die Stäbchen der Retina etc. — Nach ODENIUS (Arch. Mikr. Anat. 2. Bd. 1866 p. 463) ist sehr schwache Säure das beste Mittel für die Nervenenden in Tasthaaren: man macerirt die Haarfollikel 8—14 Tage darin. — Heisse konzentrirte Säure isolirt verhornte Gewebe (Horn, Haare, Nägel) gut. S. auch § 780 (Knochen) und 828 (Mollusken).

540. Schweflige Säure. SANDMANN (Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1885 p. 243) benutzt sie „in der Concentration, wie sie im Handel zu haben ist" für Muskeln. Diese lässt er 1—8 Tage darin maceriren, wäscht sie aus und kocht sie in Wasser auf. Die isolirten Fasern lassen sich sehr rasch vergolden, indem man sie einige Minuten in ganz schwaches Goldchlorid (1—3 Tropfen der 1 %igen Lösung auf 10 ccm Wasser) legt, auswäscht und in Wasser (mit einer Spur Essigsäure) einige Minuten lang kochen lässt.

541. Methylgemisch nach SCHIEFFERDECKER (Arch. Mikr. Anat. 28. Bd. 1886 p. 305) für die Retina. 10 Theile Glycerin, 1 Theil Methylalkohol, 20 Theile dest. Wasser. Das ganz frische Gewebe macerirt man einige Tage lang darin.

542. Lysol nach REINKE (Anat. Anzeiger 8. Jahrg. 1893 p. 532). Lysol (eine Lösung der Kresole des Theeröls in neutraler Seife) soll als 10 %ige

Lösung in Wasser oder in Wasser, Alkohol und Glycerin sehr rasch maceriren, z. B. schon in wenigen Minuten die Rindenzellen der Haare, fast augenblicklich die Epithelzellen von *Salamandra*.

Verdauen.

543. Pepsin. Nach Beale (*Arch. of Med. Vol. 1 1858 p. 296) wird der Saft aus den Magendrüsen des Schweines rasch auf Glasplatten getrocknet, pulverisirt und in gut verschlossenen Flaschen aufbewahrt. Hält sich Jahre lang. (1 Theil löst etwa 120 Theile coagulirtes Eiweiss auf.) Man löst das Pulver in destill. Wasser und filtrirt, was leicht geht, oder löst es in Glycerin. Man digerirt die Objekte in der Lösung bei 37 ° C. einige Stunden lang.

Brücke (Carnoy, Biologie cellul. p. 24) nimmt Glycerinextrakt vom Schweinemagen 1 Volumen, $^1/_5$ $^0/_0$ige Salzsäure 3 Volumina, dazu etwas Thymol.

Nach Bikfalvi (Centralbl. Med. Wiss. 21. Jahrg. 1883 p. 436 u. 833) wird 1 g mit Alkohol behandelter und getrockneter Mucosa des Magens vom Hunde mit 20 ccm $^1/_2$ $^0/_0$iger Salzsäure 3—4 Stunden in einem Brütofen digerirt und dann filtrirt. Das Objekt macerirt man in dieser Flüssigkeit $^1/_2$ bis höchstens 1 Stunde lang.

Kuskow (Arch. Mikr. Anat. 30. Bd. 1887 p. 32) löst 1 Theil Pepsin in 200 Theilen einer 3 $^0/_0$igen Oxalsäure und bringt das Objekt gleich hinein; Schnitte von gehärtetem Ligamentum nuchae sind bei gewöhnlicher Temperatur in 10—40 Minuten digerirt.

S. auch Gedoelst in: La Cellule Tome 3 1887 p. 205; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 57.

Ueber Lab und seine Bereitung s. Lörcher (Arch. Gesammte Phys. 69. Bd. 1897 p. 141).

544. Pankreatin. Schiefferdecker (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 483) macht eine gesättigte Lösung von Pankreatin (P. siccum von Dr. Witte in Rostock) in Wasser, filtrirt sie und digerirt Stücke der Epidermis 3—4 Stunden lang darin bei etwa 37 ° C. Die Kerne konserviren sich gut, und auch die Form der Stachel- und Riffzellen bleibt erhalten.

Nach Maas (Festschr. Kupffer Jena 1899 p. 211) werden bei Körperwärme durch Pankreassaft die Bindegewebfasern in der Darmwand *(Myxine)* zerstört, nicht aber die Zellen. In der Kühle hingegen (4—6° C.) bleibt das Gerüst intakt, während die Zellen verdaut werden.

Zur Demonstration des adenoiden Gewebes macerirt Hoehl (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. 1897 p. 136) Paraffinschnitte (mit Wasser aufgeklebt)

10—24 Stunden lang bei 20—37° C. in einer schwach alkalischen (0,3% Soda) $^1/_5$—$^2/_5$ %igen Lösung des Pankreatinfermentes von Mall (oder von E. Merck in Darmstadt), wäscht sie 10–20 Minuten unter der Wasserleitung vorsichtig aus und färbt sie mit Eisenhämatoxylin oder mit Orceïn nach Unna etc.

S. auch Gedoelst in: La Cellule Tome 3 1887 p. 205; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 57.

545. Trypsin nach Kühne (Unters. Phys. Inst. Heidelberg 1. Bd. 1878 p. 219). Sehr komplizirt.

22. Kapitel.

Korrodiren, Entkalken, Entkieseln, Bleichen.

Korrodiren.

546. Kalilauge, Natronlauge, Salpetersäure. Kochen oder langes Einweichen in einer starken Lösung von einem dieser drei Reagentien ist ein wirksames Mittel zur Entfernung der Weichtheile vom Skelette bei Arthropoden, Schwämmen etc.

547. Eau de Javelle (Kaliumhypochlorit) nach Noll (Z. Anzeiger 5. Jahrg. 1882 p. 528). Da die gewöhnliche Art, das Skelett von Schwämmen durch Wegbeizen der Weichtheile mit Kalilauge zu präpariren, manche Nachtheile mit sich bringt und namentlich die Spicula nicht in ihrer natürlichen Lage erhält, so lässt man besser ein Stückchen des Schwammes auf dem Objektträger so lange in einigen Tropfen Eau de Javelle liegen, bis sich alle Weichtheile gelöst haben. Dies ist bei dünnen Stücken in 20—30 Minuten der Fall. Dann bringt man vorsichtig Essigsäure hinzu, um die etwaigen Niederschläge aufzulösen, und führt zum Schlusse das Präparat durch Alkohol etc. in Balsam über.

548. Eau de Labarraque (Natriumhypochlorit) kann in ähnlicher Weise verwandt werden. Nach Looss (Z. Anzeiger 8. Jahrg. 1885 p. 333) lösen beide Flüssigkeiten Chitin in der Wärme rasch auf. Man nimmt dazu die käufliche Lösung konzentrirt (s. unten § 569) und bringt sie zum Kochen. Verdünnt man sie hingegen mit dem 4—6fachen an Wasser und macerirt darin die chitinösen Gewebe 24 Stunden oder länger, je nach der Grösse, so wird das Chitin nicht aufgelöst, wohl aber durchsichtig, weicher und auch für wässerige oder alkoholische Färbmittel durchlässiger. Dabei sollen so feine Dinge wie Nervenenden nicht leiden. Auch ist die Methode verwendbar für Nematoden und ihre Eier, die ja sonst so resistent sind, ferner zur Auflösung der Gallerte um die Eier der Amphibien (§ 590) u. s. w.

549. Korrosion nach Altmann (Arch. Mikr. Anat. 16. Bd. 1879 p. 471): Imprägnation mit Oel, dann Osmiumsäure, zuletzt Eau de Javelle. — Ueber Injektionen für Korrosionspräparate s. Rejsek (Bibliogr. Anat. Paris 4. Année 1897 p. 229). S. ferner oben § 501 u. 503 sowie Brühl (Anat. Anzeiger 14. Bd. 1898 p. 418: leicht schmelzbares Metall), Denker (Anat. Hefte 2. Abth. 9. Bd. 1900 p. 300: Wachs oder leicht schmelzbares Metall), Thoma & Fromherz (Arch. Entwickelungsmech. 7. Bd. 1898 p. 678: Paraffin) und Peabody (Z. Bull. Boston Vol. 1 1897 p. 161: Celloidin mit Berlinerblau, nachher 20%ige Salpetersäure).

Entkalken.

550. Allgemeines. Man nehme stets nur wirklich gut fixirte und gehärtete Gewebe und verlasse sich nicht sehr auf Reagentien, von denen es heisst, sie entkalken und härten frische Gewebe zugleich.

Nach dem Entkalken schaffe man die überschüssige Säure durch sorgfältiges Auswaschen mit Wasser oder Alkohol, eventuell unter Zusatz von fein gepulvertem Calciumkarbonat oder schwacher Lösung von Soda oder Ammoniak weg.

Rousseau (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1887 p. 207) bettet vor dem Entkalken die sorgfältig fixirten Gewebe (höchstens 2 ccm grosse Stücke) in Celloidin ein, bringt sie dann in 85%igen Alkohol und entkalkt sie in einem sehr sauren Gemisch von Salpetersäure (15 bis 40 Th. HNO_3 von 1,4 spez. Gew.) und Alkohol (100 Th.), entsäuert sie in Alkohol durch Zusatz von präcipitirtem Calciumkarbonat, wäscht sie nochmals mit Alkohol und schneidet sie. Die Methode eignet sich für Poriferen, Korallen, Echinodermen etc. Die Gewebe sollen dabei histologisch durchaus gut erhalten bleiben. — Stein (Anat. Anzeiger 17. Bd. 1900 p. 398) wendet diese Methode auf das Schläfenbein von Säugethieren an.

551. Entkalken von Knochen. S. hierüber Busch (Arch. Mikr. Anat. 14. Bd. 1877 p. 480), Haug (Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 1) und besonders Schaffer (ibid. 10. Bd. 1893 p. 175) sowie unten § 779 ff.

Salzsäure wirkt selbst in starker Verdünnung rasch, bringt aber die Gewebe bedenklich zum Schwellen. Man setzt, um dem abzuhelfen, wohl Chromsäure oder Alkohol oder Kochsalz zu. — S. im Uebrigen § 556. — Chromsäure wird zwar auch oft verwandt, entkalkt aber langsam und bringt die Gewebe sehr zum Schrumpfen. Daher sollte man sie auch nie stärker als 1%ig nehmen und bei zarten Geweben noch schwächer. Phosphorsäure ist für junge Knochen

empfohlen worden. Essigsäure, Milchsäure und Holzessig entkalken zwar gut, verursachen aber starke Quellungen. Pikrinsäure wirkt sehr langsam und eignet sich nur für ganz kleine Objekte.

ZIEGLER (s. § 555) hält von den gebräuchlichen Mitteln nur die Salpetersäure im Gemisch mit Alkohol und Chlornatrium und die Phosphorsäure ($2^1/_2$—10%) für gut, empfiehlt aber ganz besonders die schweflige Säure.

552. Salpetersäure. BUSCH (l. c. p. 482) zieht sie allen anderen Reagentien vor, da sie keine Quellungen verursacht, sehr wirksam ist und doch die Gewebe nicht ernstlich angreift. Man verdünnt für grosse und zähe Knochen 1 Volumen der reinen Säure von 1.25 spez. Gewicht mit 10 Volumina, für junge Knochen mit bis 100 Volumina Wasser. Frische Knochen kommen zunächst auf 3 Tage in 95 %igen Alkohol, dann auf 8—10 Tage in die Säure, die man aber täglich wechseln muss. Sobald sie ganz entkalkt sind, nimmt man sie heraus, sonst werden sie gelb; man wäscht sie 1—2 Stunden unter der Wasserleitung, bringt sie in 95 %igen Alkohol und erneuert diesen nach einigen Tagen.

Junge oder fötale Knochen bringt man zuerst in eine Lösung von 10 Theilen Kaliumbichromat und 1 Theil Chromsäure in 1000 Theilen Wasser und entkalkt sie dann in 1—2 %iger Salpetersäure unter Zusatz von $^1/_{10}$ %iger Chromsäure oder 1 % Kaliumbichromat. Legt man sie später in Alkohol, so werden sie bekanntlich grün.

553. Salpetersäure und Alkohol: 70 %iger Alkohol mit 3 % Salpetersäure; man legt die Objekte einige Tage oder Wochen hinein. Reine Salpetersäure macht auch in der Verdünnung die Knochen leicht gelatinös, während Alkohol (oder Alaun, s. § 554) dem entgegenwirkt.

Ich (MAYER) brauche schon seit vielen Jahren 5 %ige Salpetersäure in 90 %igem Alkohol und habe dies auch mündlich viel empfohlen. Neuerdings rühmt GAGE (s. § 554) sehr 67 %igen mit 3 % Säure.

THOMA (Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 191) bringt die beliebig fixirten oder gehärteten Knochen in ein Gemisch von 5 Volumina 95%igen Alkohols und 1 Volumen konz. reiner Salpetersäure, das er alle 2—3 Tage wechselt, bis sie ordentlich entkalkt sind, was spätestens in 2—3 Wochen der Fall sein muss. Er wäscht sie dann in 95%igem Alkohol, der einen Ueberschuss von präzipitirtem Calciumkarbonat enthält, 8—14 Tage lang, d. h. noch einige Tage länger, als blaues Lakmuspapier sich in dem Alkohol nicht mehr röthet. Sie lassen sich dann gut färben und weiter behandeln.

554. Salpetersäure und Alaun nach GAGE (Proc. Amer. Micr. Soc. Vol. 14 1892 p. 121; Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 104). Eine gesättigte Lösung von Alaun verdünnt man mit gleichviel Wasser und setzt zu je 20 ccm davon 1 ccm starke Salpetersäure. Man bringt in dieses Gemisch die Objekte aus Alkohol und wechselt es alle 2—3 Tage, bis die Entkalkung beendet ist. Zähne soll es vielleicht besser entkalken, als Alkohol mit Salpetersäure. Der Alaun wirkt der Quellung entgegen, die nach Gage die Salpetersäure allein hervorrufen würde.

555. Schweflige Säure. ZIEGLER (Festschr. Kupffer Jena 1899 p. 51) bringt die vorher mit Formol fixirten Knochen in gesättigte wässerige Lösung (enthält etwa 5 %) von schwefliger Säure. Die histologischen Elemente sollen dabei vorzüglich erhalten bleiben.

556. Salzsäure (s. auch § 551). RANVIER (Traité 1. Ed. p. 310) verwendet sie 50%ig und findet, sie wirkt dann sehr rasch. — Zur Verhütung der Quellungen setzt EBNER (Sitzungsb. Akad. Wien 72. Bd. 1876 3. Abth. p. 58) der 1—3%igen Säure 10—15% Kochsalz zu. — HAUG (Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 7) räth ein Gemisch von 70 Theilen Alkohol, 30 Wasser, 1/2 Kochsalz und 1—5 Salzsäure an. — SQUIRE (Methods p. 12) nimmt für Zähne 5 Theile Salzsäure und 95 Theile Glycerin.

557. Salzsäure und Chromsäure nach BAYERL (Arch. Mikr. Anat. 23. Bd. 1884 p. 36). Gleiche Theile einer 3%igen Chromsäure und 1%igen Salzsäure. Für ossifizirenden Knorpel.

558. Trichloressigsäure. PARTSCH (Verh. Ges. D. Naturf. Aerzte 66. Vers. 2. Theil 2. Hälfte 1895 p. 26) wendet sie für Knochen oder Zähne in 5%iger wässeriger Lösung an. — NEUBERGER (Centralbl. Phys. 11. Bd. 1897 p. 494) entkalkt mit 4%iger Lösung in 24 Stunden den Kopf von *Rana*, den er 1 Tag lang in Sublimat fixirt und 2 Tage lang unter der Wasserleitung ausgewaschen hatte.

559. Pikrinsäure mag man in gesättigter wässeriger Lösung nehmen. Sie löst aber selbst dann nur wenig Kalk auf, also hat man sie häufig zu wechseln. Natürlich vermeidet man Pikrinschwefelsäure wegen der Bildung von Gips. Pikrinsalzsäure oder Pikrinsalpetersäure (§ 93 u. 96) wirken zwar nach Mayer sehr rasch, aber die reichliche Entwicklung von Kohlensäure verletzt oft mechanisch die Gewebe; daher werde in vielen Fällen die Chromsäure vorzuziehen sein, besonders da sie das Zusammenfallen der Gewebe verhindert, das die Folge der Entfernung der kalkhaltigen Elemente sein kann.

VOSMAER & PEKELHARING (Verh. Akad. Amsterdam (2) Deel 6 No. 3 1898 p. 43) benutzen für Kalkschwämme eine Lösung von Pikrinsäure in Alkohol.

560. Phosphorsäure. 10—15% stark (HAUG, l. c. in § 551). Wirkt langsam und erschwert das Färben hinterher.

561. Milchsäure. Wenigstens 10% stark. Wirkt ziemlich rasch, konservirt gut, nach HAUG (l. c. in § 551) empfehlenswerth.

562. Chromsäure verwendet man in der Stärke von $^1/_{10}$%—2% (s. jedoch § 551) und lässt sie auf Knochen 2—3 Wochen einwirken. Man nehme sie zuerst schwach und verstärke sie allmählich. Jedenfalls wirkt sie nur sehr langsam, und man nimmt daher besser ein Gemisch von ihr mit einem energischeren Mittel.

563. Chromsäure und Salpetersäure nach SEILER (Fol, Lehrbuch p. 112): 70 Theile einer 1%igen Chromsäure, 3 Theile Salpetersäure, 200 Theile Wasser.

564. Arsensäure nach SQUIRE (Methods p. 11). Eine 4%ige Lösung warm (bei 30—40° C.) zu brauchen.

565. Chromosmiumessigsäure nach VAN DER STRICHT (Arch. Biol. Tome 9 1889 p. 29) und SCHAFFER (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 179).

Man darf die Objekte Monate lang darin lassen, und wenn man sie Anfangs alle 2 Tage, später langsamer wechselt, so entkalkt sie auch grössere Knochen unter guter Erhaltung der Struktur.

566. Phloroglucin und Salpetersäure (oder **Salzsäure**) nach ANDEER (Centralbl. Med. Wiss. 22. Jahrg. 1884 p. 193 u. 579; Internation. Monatschr. Anat. Hist. 1. Bd. 1884 p. 350). Das Phloroglucin allein entkalkt nicht, soll aber die Gewebe vor der Wirkung der Mineralsäuren schützen, sodass diese viel stärker genommen werden können, als sonst rathsam wäre. Die Gemische damit wirken daher sehr rasch. Andeer versetzt eine gesättigte Lösung in warmem Wasser (1 Messerspitze voll auf 1 Liter) je nach der Härte der Knochen mit 5—50% Salzsäure und wäscht diese nach der Entkalkung sorgfältig aus.

HAUG (Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 8) löst 1 g Phloroglucin in 10 g reiner Salpetersäure von 1,4 spez. Gw. vorsichtig unter leichtem Erwärmen. Die dunkelrothe Lösung wird mit 50 ccm destill. Wasser verdünnt und kann noch bis zu 300 ccm mit 20%iger Salpetersäure vermischt werden, ohne dass das Phloroglucin seinen Schutz versagt. Bei der ungemein raschen Entkalkung muss man aber gut aufpassen. Fötale und junge Knochen werden in $^1/_2$ Stunde ganz weich, kleine Stücke alter, harter Knochen in einigen Stunden. Zähne erfordern mehr Zeit oder eine Lösung mit 35—40% Salpetersäure. Man wäscht hinterher 2 Tage lang unter der Wasserleitung aus. Die Gewebe färben sich gut. Statt der Salpetersäure kann man auch 30% Salzsäure und $^1/_2$% Kochsalz nehmen.

Zum *langsamen* Entkalken nimmt man die Salpetersäure nur 2—5% stark oder auch ein Gemisch von 1 Theil Phloroglucin, 5 Theilen Salpetersäure, 30 Theilen Wasser und 70 Theilen Alkohol.

FERRERI (Bull. Accad. Med. Roma Anno 18 1892 p. 67; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 236) löst zur Entkalkung des Labyrinthes 1 g Phloroglucin warm in 100 ccm Wasser und 10 ccm Salzsäure und setzt nach dem Erkalten 200 ccm Alkohol von 70 % hinzu. Das Labyrinth kommt auf 30—40 Tage in die jede Woche zu erneuernde Flüssigkeit und wird später in 70 %igem Alkohol ausgewaschen.

SCHAFFER (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 178) räth dazu, das Phloroglucin wegen der Entwickelung salpetriger Säure nur kalt und unter einem Abzugrohr zu lösen. Das Phloroglucin scheine ähnlich der Kochsalzlösung die Gewebe zum Schrumpfen zu bringen, und hierauf beruhe wohl seine gute Wirkung beim Entkalken.

Nach mündlicher Mittheilung an Mayer ist Andeer auch jetzt noch für das Lösen des Phloroglucins in Wasser.

Entkieseln.

567. Flusssäure nach MAYER (Z. Anzeiger 4. Jahrg. 1881 p. 593). Man bringt die Objekte mit dem Alkohol in ein Glas, das innen mit Paraffin ausgekleidet ist (damit es nicht selbst angegriffen werde), und gibt tropfenweise Flusssäure hinzu, wobei man sich aber vor deren Dämpfen in Acht nehmen muss, die die Schleimhäute stark reizen. Kleine Stücke von Kieselschwämmen werden in einigen Stunden, höchstens in 1 Tag entkieselt. Die Gewebe leiden nicht darunter.

Man kann bei Schwämmen diese gefährliche Methode wohl ganz umgehen. Sind sie nämlich gut eingebettet, so kann man sie auch mit den Nadeln schneiden; wahrscheinlich brechen diese, wenn das Messer sie berührt, mit scharfen Rändern. Natürlich werden die Messer dadurch nicht besser. S. auch unten § 869.

ROUSSEAU bettet vor dem Entkieseln die Kieselschwämme in Celloidin ein (ähnlich wie beim Entkalken, s. § 550) und bringt dann (in einer Kautschukdose mit Deckel) den Block von etwa 1 cm Seitenlänge auf 1—2 Tage in ein Gemisch von 50 ccm Alkohol und 20—30 Tropfen Flusssäure; zur Entsäuerung dient Alkohol mit Pulver von Lithiumkarbonat (etwaige Niederschläge werden hinterher durch etwas Salzsäure aufgelöst) oder öfter gewechselter reiner Alkohol.

Bleichen.

568. Freies Chlor nach MAYER (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 8). Man legt in einen Glastubus einige Kristalle von Kaliumchlorat, gibt 2 oder 3 Tropfen Salzsäure darauf und giesst, wenn sich das grüngelbe Chlor zu entwickeln beginnt, einige ccm Alkohol von 50—70 % hinzu. Nun bringt man die Objekte, die bis dahin in Alkohol von 70—90 % gewesen sind, in den Tubus, worin sie zunächst schwimmen, später aber untersinken. Sie bleichen je nach Umständen in $^1/_4$ Stunde bis 1 oder 2 Tagen, ohne histologisch zu leiden. Nur

in hartnäckigen Fällen erwärme man die Flüssigkeit oder nehme mehr Säure. Auch aufgeklebte Schnitte lassen sich in dieser Weise gefahrlos bleichen. Statt der Salzsäure kann man auch Salpetersäure verwenden; dann wirkt der sich entwickelnde Sauerstoff statt des Chlors.

Die obige Methode dient sowohl zur Entfernung natürlicher Pigmente (z. B. in der Haut oder den Augen von Arthropoden) als auch zur Bleichung von Objekten, die in Osmiumgemischen zu schwarz geworden sind (s. oben p. 29), und ist nach neuesten Versuchen von Mayer der Anwendung von Wasserstoffhyperoxyd vorzuziehen (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 30). Um das Chitin von Insekten zu bleichen, setzt man zum Kaliumchlorat und zur Salzsäure keinen Alkohol, sondern Wasser (Mayer in: Arch. Anat. Phys. 1874 p. 321). S. auch § 834.

569. Eau de Labarraque. Eau de Javelle (s. § 547 u. 548). Bereitung nach Ciaccio & Campari (Mem. Accad. Bologna (4) Tomo 7 1887 p. 773) durch Einleiten von Chlor in eine in Schnee und Salz stehende 8%ige Natronlauge; enthält etwa 7 ½ % Natriumhypochlorit. — Oder einfacher durch Zerreiben von 20 Theilen Chlorkalk (28—30%) mit 100 Theilen Wasser, Zusatz einer Lösung von 25 Theilen Soda in 500 Theilen Wasser und Abgiessen der klaren Flüssigkeit vom Bodensatz 24 Stunden später.

570. Wasserstoffhyperoxyd. Pouchet (s. Duval, Précis p. 234) bringt die Objekte in Glycerin mit etwas Wasserstoffhyperoxyd (5 bis 6 Tropfen auf ein Uhrglas voll). Später haben Unna (*Monatshefte Prakt. Derm. 1883) und Solger (Centralbl. Med. Wiss. 21. Jahrg. 1883 p. 177) das Wasserstoffhyperoxyd empfohlen; Solger nimmt es in 3 %iger Lösung.

Nach Fürst (Morph. Arb. Schwalbe 6. Bd. 1896 p. 529) macerirt es bei langer Einwirkung. — Ueber das Entfernen von Chrom- oder Osmiumfärbungen aus den Geweben s. oben p. 32 und 29.

571. Andere Oxydantia. Von den Hypersulfaten habe ich (Mayer) das Ammoniumsalz mit gutem Erfolg zum Bleichen verwandt. Die geringe Menge Schwefelsäure, die bei der Benutzung in Alkohol (oder Wasser) frei wird, ist ungefährlich.

Das Magnesiumhyperoxyd habe ich ebenfalls als gutes, zwar langsam, aber zart bleichendes Mittel erprobt. Man verfährt damit ähnlich wie bei meiner Methode mit Chlor (oben § 568) und hat es durch den rascheren oder langsameren Zusatz von Salzsäure ganz in

der Hand, wie energisch der Prozess vor sich gehen soll. S. auch oben p. 30.

Das Natriumhyperoxyd nach CARAZZI (Z. Anzeiger 17. Jahrg. 1894 p. 135) ist nur bei ganz vorsichtiger Anwendung brauchbar.

CARNOY & LEBRUN (La Cellule Tome 17 1900 p. 209) bleichen Schnitte durch Eier von Amphibien mit Bromwasser.

Kaliumhypermanganat und Oxalsäure. ALFIERI (Monitore Z. Ital. Anno 8 1897 p. 57) bleicht Celloidinschnitte durch die Chorioidea etc., indem er sie zunächst auf 8—24 Stunden in eine Lösung von Kaliumhypermanganat (1 : 2000) legt und dann in einer Lösung von Oxalsäure (1 : 300 oder schwächer) einige Stunden lang entfärbt.

572. Schweflige Säure. WADDINGTON (Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 3 1883 p. 185) empfiehlt eine konzentrirte Lösung des Gases in Alkohol zum Bleichen. S. auch oben p. 29 und 32.

573. Natronlauge. RAWITZ (Leitfaden Hist. Unters. 2. Aufl. Jena 1895 p. 29) verwendet zum Lösen des Pigmentes am Mantelrande der Muscheln alkoholische Natronlauge (auf 15—20 ccm Alkohol von 96 % 3—9 Tropfen offizinelle Natronlauge).

574. Salzsäure oder **Salpetersäure.** GRENACHER (Abh. Nat. Ges. Halle 16. Bd. 1886 p. 214; Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 244) mischt zum Bleichen der Retina von Cephalopoden in toto 1 Theil Glycerin mit 2 Theilen 80 %igem Alkohol und setzt 2—3 % Salzsäure zu. Das Augenpigment löst sich hierin.

PARKER (Bull. Mus. Comp. Z. Harvard Coll. Vol. 13 1887 p. 175; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1881 p. 82) bleicht die mit Kollodium aufgeklebten Schnittserien durch die Augen von Skorpionen in 1 Minute in einem Gemisch von etwa gleichen Theilen Salpetersäure und Alkohol oder von je 18 Theilen Salpetersäure und Salzsäure und 65 Theilen Alkohol. Beim Bereiten dieser Gemische giesse man die Säuren in den Alkohol und halte das Gemisch kühl.

HENNINGS (Zeit. Wiss. Mikr. 17. Bd. 1900 p. 326) bleicht die Schnitte durch Augen von Arthropoden in einem warmen (35° C.) Gemisch von 33 Vol. Glycerin, 67 Vol. Alkohol von 80 % und 2 Vol. Salpetersäure.

575. Chromsalpetersäure. Das Gemisch von Seiler (oben § 563) benutzt JANDER (Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1898 p. 163) zum Bleichen der Augen von Arthropoden, des Mantels von Lamellibranchiaten und des Peritoneums von Eidechsen. Er wäscht die Säure im Dunkeln aus.

23. Kapitel.

Methoden zu embryologischen Untersuchungen.

576. Künstliche Befruchtung. Dieses bequeme Mittel zur Erlangung der frühesten Stadien mancher Thiere lässt sich sehr leicht bei den anuren Amphibien, den Teleostiern, Cyclostomen, Echinodermen und vielen Würmern und Cölenteraten anwenden.

Handelt es sich um Amphibien, so öffnet man ein Männchen und ein Weibchen, nimmt die Eier aus dem Uterus, bringt sie in ein Uhrglas oder eine Präparirschale und giesst das Wasser, womit man die Hoden, besser noch die Vasa deferentia, des Männchens zerzupft hat, hinzu.

Aus den Weibchen der Knochenfische lassen sich durch sanften Druck auf den Bauch die Eier leicht ausstreichen, ebenso aus den Männchen das Sperma. (Zuweilen, z. B. bei *Gasterosteus*, muss man das Männchen tödten, die Hoden herausschneiden und zerzupfen.) Das Sperma der Fische, besonders der Salmoniden, stirbt in Wasser sehr rasch ab; man gibt es daher am besten direkt zu den Eiern, setzt etwas Wasser hinzu und bringt nach einigen Minuten das Ganze in einen Brütapparat mit fliessendem Wasser.

Mit den Invertebraten geht es ebenfalls meist leicht. Zuweilen kann man die Befruchtung sogar unter dem Mikroskop vornehmen und so das Eindringen des Samenfadens etc. beobachten, wie es Fol, die Hertwigs, Selenka u. A. gethan haben.

577. Beobachtungen am lebenden Objekte. Die Entwickelung mancher Thiere, besonders einiger Invertebraten, lässt sich einigermassen an den lebenden Eiern unter dem Mikroskope verfolgen. Dies gilt z. B. mit Vortheil von manchen Knochenfischen, ferner von *Chironomus*, Crustaceen, Ascidien, Mollusken, Cölenteraten etc.

Die Eier einiger Insekten und Arachniden, die sonst völlig undurchsichtig sind, werden in einem Tropfen Oel durchsichtig, und sorgt man dafür, dass das Oel nur die Oberfläche imprägnirt und nicht tiefer eindringt, so geht die Entwicklung normal weiter (BALBIANI).

578. Fixiren der Eier und Embryonen. Kleine Embryonen fixirt Osmiumsäure allein oder mit anderen Reagentien zusammen recht gut, nicht aber grosse. Sie bringt die Zellen etwas zum Schrumpfen und lässt so die Spalten zwischen den Keimblättern sehr klar hervortreten, ebenso Kanäle oder Hohlräume, die in der Bildung begriffen sind. Ferner hilft sie, da sie fettige Substanzen, also auch Myelin, schwärzt, beim Studium der Entwicklung des Nervensystems.

Chromsäure ist für die Untersuchung der äusseren Gestalt der Embryonen unentbehrlich: sie lässt Erhöhungen und Vertiefungen klar hervortreten und erhält die gegenseitigen Beziehungen der Theile äusserst gut, dagegen durchaus nicht immer die Form der Zellen, bildet auch ein Hinderniss für das Färben in toto.

Pikrinsäure und Gemische damit wirken entgegengesetzt wie Osmiumsäure: sie bringen die Zellen etwas zum Quellen und verdecken daher etwaige leere Räume in den Geweben.

RABL (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 165) empfiehlt für die Embryonen von Wirbelthieren (aber auch für andere Objekte) folgendes Gemisch: 1 Volumen 1 %ige Platinchloridlösung, 1 Vol. gesättigte Sublimatlösung und 2 Vol. destillirtes Wasser. Dies wendet er so, wie es da ist, für Keimscheiben und junge Embryonen aller Wirbelthierklassen an. Aeltere Embryonen von Teleostiern hingegen fixirt er in der heissen Flüssigkeit, um die Ruptur der Muskeln und das Schrumpfen der Chorda zu verhüten. Ferner empfiehlt Rabl sein Gemisch von Pikrinsäure und Sublimat (§ 65) besonders für etwas ältere Embryonen (z. B. *Gallus* vom 3—4. Tage). Die Embryonen bleiben meist etwa 12 Stunden, jüngere kürzer, ältere bis zu 48 Stunden darin, werden einige Stunden in Wasser ausgewaschen und dann gradatim in Alkohol gebracht (dieser ist alle Stunden etwas zu verstärken), sodass sie nach 24 Stunden in 80—90 %igem liegen; von da in absoluten.

Um eine Menge Eier von Echiniden gleichzeitig färben, einbetten und schneiden zu können, wickelt BOVERI (Verh. Physik. Med. Ges. Würzburg 29. Bd. 1895 p. 4) sie in Fetzen der Epidermis von *Cryptobranchus* ein. — SOBOTTA (Arch. Mikr. Anat. 50. Bd. 1897 p. 21) verwendet für die Eier von *Amphioxus* zu gleichem Zweck das Amnios von Säugethieren, COE (Z. Jahrb. Abth. Morph.

12. Bd. 1899 p. 427) für die Eier von *Cerebratulus* abgeworfene Hautfetzen von *Rana* oder *Triton*.

579. Rekonstruktion der Embryonen nach Schnitten. Das Studium von Schnittserien durch irgend ein hoch organisirtes Thier ist so komplizirt, dass man oft genug seine Zuflucht zu graphischen oder plastischen Rekonstruktionen nehmen muss, um sich vom ganzen Thier eine genaue Idee oder ein Modell zu verschaffen.

A. Graphische Rekonstruktion. Für einfache Fälle mag man nach SCHAFFER (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 342) die Schnitte auf Pauspapier zeichnen, sie richtig übereinander schichten und gegen das Licht halten, um den Verlauf der Organe durch alle Papiere hindurch zu verfolgen. — VOSMAER (Anat. Anzeiger 16. Bd. 1899 p. 269) zeichnet die Schnitte auf Celluloidplatten.

WOODWORTH (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 15) rekonstruirt aus Serien von Querschnitten die Umrisse des Objektes und seiner Organe im optischen Längschnitt durch Messungen mit dem Mikrometer und Auftragung der Zahlen im richtigen Verhältniss als Linien quer zur Längsaxe des Objektes. — S. auch in der 1. Auflage dieses Buches p. 270 die Methode von FOL (Lehrbuch p. 85); ferner KASTSCHENKO (Anat. Anzeiger 2. Jahrg. 1887 p. 426 und 579) und STRASSER (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 179; 4. Bd. 1887 p. 168).

B. Plastische Rekonstruktion. Sie wird in der Regel nach Paraffinschnitten ausgeführt, gewährt aber nur bei ganz sorgfältigen Schnittserien guten Erfolg. Im Wesentlichen handelt es sich um das Zeichnen sämmtlicher oder wenigstens der hauptsächlichsten Schnitte auf Pappe, Zinkblech, Wachs oder ähnliches Material, das Ausschneiden dieser Zeichnungen entweder mit der Scheere oder dem Hohlmeissel etc., das Aufeinanderbauen der ausgeschnittenen Platten in der richtigen Reihenfolge und das Verkitten derselben miteinander zu einem Ganzen, das bei genauer Innehaltung sämmtlicher Vorschriften dem vergrösserten Objekt gleich sein wird und eventuell hinterher nach anderen Richtungen zerschnitten werden kann. Man hat natürlich in erster Linie darauf zu achten, dass die Dicke der plastischen Platten genau im Verhältniss zur Dicke der Schnitte und zur Vergrösserung der Zeichnungen steht. Ferner dürfen die Schnitte keine Falten haben und auch sonst nicht verzerrt sein; endlich hat man am Paraffinblock besondere Richtebenen oder Richtlinien anzubringen, die beim Schneiden als Linien oder Punkte erscheinen und

als solche auf den Zeichnungen reproduzirt werden müssen, um beim Aufbau der Platten als Marken zu dienen.

Als Material für die Platten nimmt man gegenwärtig meist Wachs, das zweckmässig nach Strasser und Born auf der einen Fläche gleich mit Papier überzogen ist; käuflich sind die Platten bei Grübler & Hollborn zu haben, lassen sich aber auch mit dem Apparat von Born (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 448) nach einiger Uebung selbst ziemlich leicht herstellen.

Zum Schneiden der Richtebenen am Block dient entweder der kleine Apparat von Kastschenko oder der Zuschneider von Schaffer (oben p. 99 § 147) etc. Auch kann man nach Born & Peter (Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1899 p. 39) das Objekt beim Einbetten in eine genau rechteckige Form so orientiren, dass man später die Basis des Blockes als Richtebene benutzt; die Grundplatte der Form trägt daher einige parallele Linien eingeritzt, die auf dem Block erhabene Richt- oder Definirlinien bilden. (Die Einzelheiten s. im Original.)

Damit die Richtebenen oder -linien auf den Schnitten kenntlich bleiben, müssen sie mit einer dunklen Farbe überzogen werden, die sich in Xylol und Balsam, eventuell auch in Alkohol und wässerigen Färblösungen nicht verwischen darf. Man nimmt dazu in der Regel Russ, in Kollodium oder Celloidinlösung eingerührt, oder Zaponlack mit Russ (Neumayer in: Festschr. Kupffer Jena 1899 p. 459) oder Schuhlack (Peter in: Verh. Anat. Ges. 13. Vers. 1899 p. 136) etc. Dann taucht man den ganzen Block in geschmolzenes Paraffin ein und erhält später Schnitte, die neben dem Objekte eine oder mehrere dunkle Linien oder Punkte als Marken beim Rekonstruiren zeigen. — Für Celloidinblöcke brauchen Born & Peter (l. c. p. 48) ein Gemisch von Berlinerblau, Terpentinöl und Aether.

Die Paraffinschnitte werden mit Vortheil nicht unter 20 μ dünn gemacht; so vermeidet man Verzerrungen so gut wie ganz. Man klebt sie mit Wasser auf, lässt aber dieses nicht über 40° C. warm werden. Nach dem Trocknen überstreichen Born & Peter (l. c. p. 47) sie noch mit Kollodium nach Strasser (oben § 189), doch ist dies nicht absolut nöthig.

Man kann auch solidere Mittel als Lack anwenden, um neben dem Objekt eine Definirlinie zu erhalten. So klebt Alexander (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 340) sorgfältig zugeschnittene Streifen von Leber an den Paraffin- oder Celloidinblock an; ebenso

Suschkin (Nouv. Mém. Soc. Natural. Moscou Tome 16 1899 p. 34). Wilson (Zeit. Wiss. Mikr. 17. Bd. 1900 p. 171) bettet lange, durch Osmium geschwärzte Nervenfasern mit ein.

Die plastische Rekonstruktion führt erst bei grosser Ausdauer zum Ziele und kostet selbst in geübter Hand sehr viel Zeit, mitunter auch nicht wenig Geld. Sie wird übrigens, obwohl seltener, auch für verwickelte Einzelheiten im Bau erwachsener Thiere angewandt.

S. auch Born (Morph. Jahrb. 2. Bd. 1876 p. 579; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 433); His (Anat. Anzeiger 2. Jahrg. 1887 p. 382); Strasser (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 186; 4. Bd. 1887 p. 168 u. 330); Kastschenko (ibid. 5. Bd. 1888 p. 173); Schaper (ibid. 13. Bd. 1897 p. 446); Alexander (ibid. 14. Bd. 1897 p. 334; 15. Bd. 1899 p. 446); Broman (Anat. Hefte 1. Abth. 11. Bd. 1899 p. 557); Peter (Morph. Jahrb. 25. Bd. 1898 p. 557).

Säugethiere.

580. Kaninchen. Die ganz jungen Eier sucht man in den Tuben. Hat man diese und den Uterus herausgeschnitten, so lässt man sie kalt werden und wartet, bis die Kontraktionen aufgehört haben. Dann präparirt man die Peritonealhülle ab, legt die Tuben auf ein langes Stück Glas, schneidet sie auf, breitet ihre Mucosa aus und durchsucht sie mit einer Lupe oder unter dem Mikroskop mit einer schwachen Linse. Hat man ein Ei gefunden, so gibt man einen Tropfen einer „indifferenten“ Flüssigkeit darauf und nimmt es mit der Spitze des Messers, der Nadel oder Pipette fort. Man untersucht es lebendig in der Peritonealflüssigkeit der Mutter, wenn diese getödtet worden ist, oder in ihrem Humor aqueus oder in Amnioswasser etc. (§ 387 ff.). Findet man aber die Eier nicht gleich, so schabt man das Epithel der Mucosa mit einem Messer ab, mischt es mit etwas indifferenter Flüssigkeit und sucht darin die Eier unter dem Mikroskop bei durchfallendem Lichte.

Kölliker injizirt Müllers Gemisch oder schwache Osmiumsäure in den Ovidukt und fängt die auslaufende Flüssigkeit in Uhrgläsern auf, worin sich dann die Eier unter dem Mikroskop leicht finden lassen.

So lange die Eier noch frei und mit blossem Auge sichtbar in den Uterushörnern liegen, sind sie in der nämlichen Weise wie früher aus den Tuben leicht zu erhalten. Später aber treiben sie die Wand der Hörner vor, und dann zerschneidet man die Hörner in so viel Stücke, wie Hervorragungen da sind, und zwar so, dass die Eier in der Mitte der Stücke liegen. Letztere befestigt man in einer Secirschale mit Nadeln so, dass die Wölbungen nach oben

schauen, füllt die Schale mit Serum oder Müllers Gemisch, 1 %iger Osmiumsäure etc., schneidet mit einem Messer die Wand der Wölbungen bis auf die Muskelschicht an, zerzupft die Mucosa mit zwei Pincetten und macht so das Ei frei.

Sobald die Eier sich im Uterus festgesetzt haben, kann man sie natürlich nicht mehr ganz herausschälen. Da der Embryo immer an der mesometralen Seite des Uterus liegt, so öffnet man die Wölbung durch einen Kreuzschnitt und befestigt den Streifen der Mucosa, woran der Embryo sitzt, mit Nadeln in der Secirschale. VAN BENEDEN & JULIN (Arch. Biol. Tome 5 1885 p. 308) haben diese Operation unter blutwarmem Serum von Kronecker (§ 390) ausgeführt und so den Embryo Stunden lang am Leben gehalten.

RETTERER (C. R. Soc. Biol. Paris (8) Tome 4 1887 p. 99) öffnet bei Eiern vom 7. Tage die Stücke des Uterus von der Mesometralseite her (weil das Ei sich an diese Seite noch nicht angeheftet hat), lässt mit einer Pipette Pikrinschwefelsäure zwischen Ei und freie Fläche des Uterus fliessen und erhält so das Ei als geschlossene Blase.

Zu Dauerpräparaten bringt VAN BENEDEN (Arch. Biol. Tome 1 1880 p. 149) das lebende Ei auf den Objektträger in einen Tropfen 1 %iger Osmiumsäure und von da in Müllers Gemisch (oder Pikrinschwefelsäure oder Ammoniumbichromat). Nach einer Stunde wechselt er die Flüssigkeit und legt den Objektträger auf 2—3 Tage in eine feuchte Kammer. Dann gibt er allmählich immer stärkeres Glycerin hinzu und hebt das Ei definitiv in reinem, mit etwas Ameisensäure versetztem Glycerin auf.

Um die Grenzen der Blastodermzellen gut zu sehen, bringt er das lebende Ei in eine 1/3 %ige Lösung von Höllenstein auf 1/2—2 Minuten (je nach dem Alter), dann in Wasser und setzt es dem Lichte aus; die Präparate sind aber nicht haltbar, da sie rasch zu dunkel werden.

Vier Tage alte und ältere Keimblasen öffnet man mit Nadeln, färbt das Blastoderm und bringt es in Glycerin oder Balsam oder vergoldet es.

Um Schnitte zu erhalten, fixirt van Beneden 24 Stunden lang mit Chromsäure (1:400, sorgfältig auswaschen und in immer stärkeren Alkohol überführen). Diese härtet nämlich die Keimblase gut und belässt zugleich die Epiblastzellen völlig in Kontakt mit der Zona pellucida. Auch Pikrinschwefelsäure empfiehlt van Beneden, ebenso KÖLLIKER (Festschr. Univ. Würzburg Leipzig 1882 Sep. p. 6; Z.

Anzeiger 3. Jahrg. 1880 p. 372), und HENNEGUY schreibt mir (Lee), er wende sie oft für Keimscheiben und ältere Embryonen an, stets mit ausgezeichnetem Erfolge. Auch Fols Modifikation von Flemmings Gemisch, ferner Osmiumsäure und Alkohol nach Ranvier und Vignal (s. oben p. 28) seien brauchbar.

PIERSOL (Zeit. Wiss. Z. 47. Bd. 1888 p. 155) verwendet entweder Pikrinschwefelsäure oder für junge Stadien 3 %ige Salpetersäure nach Altmann (oben p. 37).

WINIWARTER (Arch. Biol. Tome 17 1900 p. 39) fixirt die Embryonen (zum Studium des Ovariums) unter Anderem 6 Stunden lang mit einem Gemisch aus 50 ccm gesättigter Sublimatlösung (in Kochsalzlösung von $^1/_2$ %), 50 ccm Alkohol von 95 %, 20 ccm 1 %iger Lösung von Platinchlorid und 5 ccm Essigsäure.

SOBOTTA (Anat. Hefte 1. Abth. 8. Bd. 1897 p. 476) fixirt zum Studium der Corpora lutea die Ovarien entweder unaufgeschnitten mit Pikrinsublimat (gleiche Theile gesättigter wässeriger Lösung von Pikrinsäure und Sublimat) + 2 % Eisessig, oder nach Anbringung tiefer Einschnitte mit Flemmings schwachem Gemisch. — S. auch CLARK (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. 1898 p. 104: Corpora lutea von *Lepus, Cavia* und *Mus*; Verdaumethode nach Hoehl).

581. Andere Säugethiere. SELENKA (Studien Entw. Thiere 1. Heft Wiesbaden 1883 p. 5) fixirt die Uteri von *Mus* uneröffnet in Pikrinschwefelsäure. — SOBOTTA (Arch. Mikr. Anat. 45. Bd. 1895 p. 24) fixirt zum Studium der Befruchtung und Furchung bei *Mus musculus* die Ovarien nebst Tuben und Uterus in schwachem Gemisch von Flemming 24 Stunden lang (dann Wasser, Alkohol von 60—70 % etc.; Färbung der Paraffinschnitte mit Eisenhämatoxylin nach Benda; Pikrinschwefelsäure taugt nicht).

KEIBEL (Morph. Arb. Schwalbe 2. Bd. 1893 p. 11) steckt die Uteri von *Sus scrofa* mit der Mesometralseite nach unten in einer flachen Wanne fest, schneidet von der Muscularis einen Längsstreifen aus, sodass die Schleimhaut frei liegt, füllt nun erst in die Wanne Pikrinschwefelsäure oder 4 %ige Salpetersäure und reisst die Schleimhäute mit Pincetten vorsichtig auf. Die herauspräparirten Embryonen fixirt er entweder in diesen Gemischen oder in Sublimat.

BONNET (Anat. Hefte 1. Abth. 9. Bd. 1897 p. 426) eröffnet den Uterus von *Canis* in warmem Normalsalzwasser mit spitzen Pincetten und überträgt die aufgefischten Keimblasen sofort in das Fixirgemisch

(am besten ist die „gesättigte Sublimatkochsalzlösung"). . Wenn diese aber bereits festsitzen, so fixirt er den ganzen Uterus. Der kurze Aufenthalt im Salzwasser schadet den Keimblasen nicht. Dies gibt auch WEYSSE (Proc. Amer. Acad. Arts Sc. Vol. 30 1884 p. 285) von *Sus scrofa* an und verwendet zum Fixiren Pikrinschwefelsäure. Letztere braucht ferner HUBRECHT für *Sorex*, *Erinaceus* und *Talpa*.

SELENKA (Studien Entw. Thiere 4. Heft Wiesbaden 1887 p. 107) fixirt die Keimblasen von *Didelphys virginiana* in Pikrinsäure, der $^1/_{10}$ % Chromsäure zugesetzt ist. Die uneröffneten Uterushörner müssen aber zuvor 5—7 Minuten lang in absol. Alkohol liegen, damit die Muskulatur abstirbt.

Nach NEUMAYER (Festschr. Kupffer Jena 1899 p. 458) fixirt man die Embryonen von *Ovis* am besten mit Carnoys Gemisch von Chloroform, Alkohol und Essigsäure (oben § 82).

S. auch § 580 (CLARK).

Vögel.

582. Beobachtung am lebenden Objekte. Anleitung hierzu geben die Grundsätze der Entwickelungsgeschichte der Thiere von FOSTER & BALFOUR (deutsch von Kleinenberg Leipzig 1876) p. 238—262. Hier seien nur einige neuere Daten nachgetragen.

Will man einen lebenden Embryo bei durchfallendem Lichte studiren, so öffne man das Ei unter Salzwasser, entferne ein wenig Eiweiss durch das Fenster (s. unten), nehme das Ei aus der Lösung heraus und lege einen Ring von gummirtem Papier so auf den Dotter, dass er den Keimhof umgibt. Sobald (nach wenigen Minuten) das Papier an der Dotterhaut haftet, schneide man das Blastoderm nach aussen vom Papier rings durch, bringe das Ei in das Salzwasser zurück, nehme den Ring mit dem Blastoderm heraus und bringe ihn in einem Uhrglase oder auf einem Objektträger unter das Mikroskop (DUVAL).

583. Fenster nach Gerlach (Sitzungsb. Physik. Med. Ges. Erlangen 17. Heft 1885 p. 53). Mit einer Scheere nehme man vom spitzen Ende des Eies die Schale fort, giesse ein wenig Eiweiss aus, gebe es aber, sobald sich die Keimscheibe unter die Oeffnung geschoben hat, wieder zurück ins Ei. Nun bestreiche man die Ränder der Oeffnung (des „Fensters") mit Gummischleim, baue einen niedrigen Wall von Watte darum, lege hierauf ein kleines Uhrglas oder rundes Deckglas und kitte es mit Gummi fest; ist das Gummi trocken, so streiche man erst Kollodium, dann Bernsteinfirniss darüber und bringe das

Ei in den Brütofen zurück. Durch dies Fenster kann man die Entwickelung bis zum 5. Tage verfolgen. — Ueber das Embryoskop von GERLACH s. Anat. Anzeiger 2. Jahrg. 1887 p. 591.

584. Präparation des Embryos. Während des ersten Brüttages lässt sich das Blastoderm nur sehr schwer vom Dotter abheben und wird daher besser mit ihm zusammen fixirt oder gehärtet. Später jedoch geht es leicht los, und man unterlasse es daher ja nicht, es zu entfernen. Um das Ei zu öffnen, schlage man mit raschem Hiebe die Schale am breiten Ende auf und nehme sie von dort aus vorsichtig in kleinen Stücken mit einer Pincette weg, bis das Blastoderm freiliegt. Dies muss unter Salzwasser (von 0,75 %) geschehen, dann aber hebt man das Ei ein wenig heraus, sodass das Blastoderm nicht mehr davon bespült wird, und tropft auf dieses mit einer Pipette ein Fixirgemisch (1 % ige Osmiumsäure, Pikrinschwefelsäure, 10 % ige Salpetersäure etc.). Indem man das obere Ende der Pipette geschlossen, das untere aber in Kontakt mit der Flüssigkeit auf dem Blastoderm hält, kann man dieses ganz leicht einige Minuten unter der Flüssigkeit halten, und dann wird es hart genug sein, um herausgeschnitten zu werden. (Natürlich kann man auch das Ei direkt in der Fixirflüssigkeit, z. B. 10 % iger Salpetersäure, öffnen und das Blastoderm sich in 15—20 Minuten fixiren lassen.) Nun legt man das Ei wieder in das Salzwasser zurück, schneidet rund um den Keimhof herum, löst das Blastoderm los und schwemmt es in ein Uhrglas hinein, um es entweder unter dem Mikroskop zu studiren oder es in ein Härtgemisch zu bringen; bevor man jedoch letzteres thut, sollte man mit einer Pincette unter Schütteln die Dotterhaut vom Blastoderm entfernen. Das Fixiren mit 10 % iger Salpetersäure erleichtert nach HOFFMANN (Arch. Mikr. Anat. 41. Bd. 1893 p. 46) die Ablösung des Blastoderms sehr; man lässt die Säure 10 Minuten lang wirken und ersetzt sie vorsichtig durch 2 % ige Lösung von Alaun.

FOSTER & BALFOUR empfehlen zum Härten Pikrinschwefelsäure (5 Stunden lang) und lassen dann direkt Alkohol folgen; oder $^1/_{10}$ %ige Chromsäure (24 Stunden), dann $^3/_{10}$ % ige (24 Stunden), 70 % igen Alkohol (ebenso lang), 90 % igen (2 Tage), endlich absoluten; oder $^1/_2$ % ige Osmiumsäure ($2^1/_2$ Stunden im Dunkeln), Wasser, absoluten Alkohol. — SUSCHKIN (Nouv. Mém. Soc. Natural. Moscou Tome 16 1899 p. 34) nimmt Sublimat und färbt mit Hämacalcium (bei kleineren Embryonen mit Alkohol auf das Doppelte, bei grösseren auf das 4—5 fache verdünnt) bis 5 Tage lang durch.

Färben und Schneiden wie gewöhnlich. Junge Embryonen kann man auch ganz in Glycerin oder Balsam einschliessen.

585. Orientirung des Embryos. Die frühesten Stadien vor dem Auftreten des Keimstreifs lassen sich nicht leicht orientiren, um Schnitte in einer bestimmten Richtung machen zu können. DUVAL (Ann. Sc. N. (6) Tome 18 1884 Art. No. 1 p. 3) geht von der Beobachtung aus, dass der Embryo fast stets auf dem Dotter das breite Ende zur linken, das schmale zur rechten Seite hat, und bezeichnet nun die Lage des Blastoderms auf folgende Weise. Einen Streifen Papier von 5 mm Breite und 50 mm Länge faltet er zu einem dreieckigen Trog ohne Boden um. Diesen setzt er auf den Dotter so auf, dass die Basis des Dreiecks dem Vorderende des Embryos entspricht, die Spitze dem Hinterende, füllt ihn durch eine Pipette mit $^3/_{10}$ %iger Osmiumsäure und legt, sobald das Blastoderm dunkel wird, das Ei in schwache Chromsäure, entfernt das Eiweiss und bringt das übrige Ei auf einige Tage in frische Chromsäure. Nach der Härtung zeigt sich dann auf dem Dotter ein schwarzes Dreieck um die Keimscheibe und gibt deren Lage an; dieses schneidet man mit Messer und Scheere aus und härtet es völlig in Chromsäure und Alkohol.

KIONKA (Anat. Hefte 1. Abth. 3. Bd. 1894 p. 414; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 250) öffnet das Ei unter 0,6 %igem Salzwasser, befreit es von Schale und Eiweiss und bezeichnet die Pole, indem er etwa 1 cm weit von der Keimscheibe Igelstacheln einsticht, von denen der am stumpfen Pole einen rothen Faden trägt. Dann legt er es vorsichtig in Wasser von 90° C. auf Watte, bringt es nach 10 Minuten in 70 %igen Alkohol und schneidet 24—36 Stunden später die Keimscheibe nebst etwas Dotter als gleichschenkliges Dreieck heraus, dessen Basis das vordere Ende der Keimscheibe anzeigt. Einbettung durch Cedernöl in Paraffin, Färbung mit Boraxkarmin, Entfärbung mit saurem ($^1/_4$ %) Alkohol, dem auf je 5 ccm ein Tropfen konzentr. wässeriger Lösung von Orange G zugesetzt ist, um den Dotter zu färben.

MITROPHANOW (Anat. Hefte 1. Abth. 12. Bd. 1899 p. 200) braucht zum Fixiren 3 %ige Salpetersäure. Soll die Keimscheibe orientirt sein, so wird sie nach vorsichtigem Aufbrechen der Schale in situ mit der Säure beträufelt (das koagulirte Eiweiss wird mit einem Pinsel entfernt), nach etwa einer halben Stunde mit der Dotterhaut als Fünfeck oder Dreieck (die Spitze nach dem Kopfende zu) aus-

geschnitten, auf einige Stunden in 30 %igen und von da allmählich in stärkeren Alkohol gebracht. Auch kann die Keimscheibe nach der Fixirung noch in situ mit Pikrinsublimat oder Flemmings Gemisch ½ Stunde lang gehärtet werden. Will man die Scheibe ohne Dotterhaut haben, so muss man vor deren Loslösung das Kopfende durch einen Einschnitt bezeichnen. — Zum Fixiren ohne Orientirung (p. 205) wird nach Abgiessen des meisten Eiweisses der unverletzte Dotter aus dem Ei direkt in die Salpetersäure übertragen und dort weiter behandelt.

586. Andere Methoden für *Gallus*. Nach VIALLETON (Anat. Anzeiger 7. Jahrg. 1892 p. 624) wird das Ei unter Salzwasser geöffnet, das Blastoderm herausgeschnitten, auf eine Glasplatte gebracht, mit 1 %iger Lösung von Höllenstein behandelt, mit Wasser gewaschen und auf 6—12 Stunden in 70 %igem Alkohol ins Dunkle gestellt. Färben in Boraxkarmin, Einschliessen in Dammar.

BÖHM & OPPEL (Taschenbuch 3. Aufl. 1896 p. 180) fixiren die Eier mit mittelgrossen Embryonen in einem Gemisch von 20 Theilen 3—5 %iger Salpetersäure und 1—2 Theilen einer 1 %igen Lösung von Höllenstein.

Man sehe auch die Methode von HIROTA (Journ. Coll. Sc. Japan Vol. 6 1894 p. 367; Journ. R. Micr. Soc. London 1895 p. 118) zur Untersuchung der Embryonalhäute: Erweichung der Schale in Pikrinschwefelsäure.

587. Anas. FISCHEL (Morph. Jahrb. 24. Bd. 1896 p. 371) fixirt die Embryonen in Rabls Sublimatplatinchlorid (oben § 69), wäscht sie mit Wasser, führt sie durch Alkohol in Nelkenöl über und studirt sie in diesem.

Reptilien.

588. Allgemeines. Die oben für die Vögel angegebenen Methoden sind auch auf die Reptilien anwendbar, soweit sie Eier legen. Die frühesten Stadien fixirt man in situ auf dem Dotter; ältere Embryonen kann man für sich fixiren.

BÖHM & OPPEL (Taschenbuch 4. Aufl. 1900 p. 186) fixiren die unter Normalsalzwasser geschälten Eier in Sublimatlösung mit 20 % Eisessig oder in Sublimatchromsäure nach Lo Bianco (oben § 67) oder in Pikrinschwefelsäure, schneiden die Keimscheibe nachher in Wasser aus und bringen sie in Alkohol. Bei ganz jungen Stadien schneiden sie die Keimscheibe aber erst nach der Härtung des Eies im Alkohol mit dem Rasirmesser ab. Auch bringen sie wohl die ganzen Eier auf 5—6 Stunden in Pikrinschwefelsäure oder auf 24 Stunden in Pikrinessigsäure, entfernen dann unter Wasser die Schale und behandeln den Embryo allein weiter.

589. Spezielle Fälle. MITSUKURI (Journ. Coll. Sc. Japan Vol. 6 1894 p. 229) fixirt die Embryonen von Schildkröten hauptsächlich mit Pikrinschwefelsäure. Handelt es sich um das Blastoderm, so nimmt er die ganze Schale und vom Eiweiss möglichst viel fort, bezeichnet die Stelle, wo das Blastoderm liegt, mit einem Haar, bringt das Ei mit dem Blastoderm nach oben in die Säure und schneidet letzteres nach einigen Stunden heraus, um es noch länger allein zu härten. Junge Embryonen haften gewöhnlich an der Schale an, können also mit dem betreffenden Stück von ihr wie in einem Uhrglase fixirt werden und werden nach $^1/_2$ Stunde von der Schale abgelöst und weiter gehärtet. Sind aber schon die Embryonalhüllen vorhanden, so wird die Schale an einer Stelle abgeschabt und mit Pikrinschwefelsäure behandelt, bis ein kleines Loch entsteht; von hier aus fährt man mit Schaben und Auftröpfeln von Säure fort, bis sich ohne Verletzung der Hüllen die ganze Schale entfernen lässt.

WILL (Z. Jahrb. Abth. Morph. 6. Bd. 1892 p. 8) öffnet die Eier von *Platydactylus* in dem Fixirgemisch (besonders Chromsäure oder Chromosmiumessigsäure, die aber nur wenig Osmiumsäure enthält) und härtet die Embryonen sammt dem Dotter. — Die Embryonen von *Cistudo* und von *Lacerta* behandelt er (1893 u. 1895) ebenso. — MEHNERT (Anat. Anzeiger 11. Bd. 1895 p. 257) ist mit Wills Methoden nicht einverstanden; seine eigenen sind beschrieben in: *Morph. Arb. Schwalbe 1. Bd. 1891 p. 370.

STRAHL (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1881 p. 123) verwendet für *Lacerta* Pikrinschwefelsäure.

KUPFFER (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1882 p. 4) öffnet die dem Ovidukt entnommenen Eier von *Lacerta, Emys, Coluber* etc. unter Osmiumsäure (1 : 1000), entfernt das Eiweiss möglichst gut, bringt den Dotter auf 24 Stunden in Chromsäure (1 : 300), schneidet um das Blastoderm herum ein, hebt es heraus, wäscht es in Wasser, legt es auf 3 Stunden in Glycerin, Alkohol und Wasser zu gleichen Theilen, endlich in Alkohol von 90%.

BÖHM & OPPEL (Taschenbuch 3. Aufl. 1896 p. 178) legen die Eier von *Lacerta* und *Anguis* auf 2—3 Stunden in „Sublimat-Eisessig (5%)", dann auf 8—24 Stunden in eine gesättigte wässerige Lösung von Pikrinsäure, lösen darauf unter Wasser die Schale ab und bringen die Eier oder nur die Embryonen direkt in 70%igen Alkohol.

Amphibien.

590. Allgemeines. Um die Eier zum Schneiden zu präpariren, muss man zunächst die dicke Gallerte entfernen. Dies lässt sich

durch Einlegen der Eier in 1 %ige Chromsäure auf 2—3 Tage und häufiges Schütteln erreichen, aber die Eier werden dabei sehr brüchig. — WHITMAN (Amer. Natural. Vol. 22 1888 p. 857) bringt dagegen die vorher fixirten Eier in eine 10 %ige Lösung von Natriumhypochlorit, die mit dem 5—6 fachen an Wasser verdünnt ist, auf so lange, bis man sie durch Schütteln frei machen kann, was z. B. bei *Necturus* in einigen Minuten der Fall ist. — BLOCHMANN (Z. Anzeiger 12. Jahrg. 1889 p. 269) legt die mit Flemmings Gemisch fixirten Eier auf 15—30 Minuten in verdünnte Eau de Javelle (1 Theil und 3—4 Theile Wasser) und bewegt sie darin. (Nachher kommen sie wie gewöhnlich in Alkohol.) Einige andere Methoden sind in den nächsten §§ angegeben. S. ferner oben § 64 (LEE).

CARNOY & LEBRUN (La Cellule Tome 12 1897 p. 212) fixiren das Keimbläschen der Batrachier entweder, indem sie die Eier auf dem Objektträger zerdrücken und es dann den Dämpfen von Osmiumsäure oder schwefliger Säure aussetzen, oder indem sie die mit der Scheere angeschnittenen Eierstöcke auf 1/4—1 Stunde in das Sublimatgemisch von Gilson (oben § 64) legen, 1 Stunde auswaschen und allmählich in 80 %igen Alkohol bringen. Beim Einbetten in Paraffin verfahren sie, um den Dotter nicht brüchig zu machen, vorsichtig: sie bringen die Eier aus dem 80 %igen auf 1/4 Stunde in 95 %igen, auf 5 Minuten in absoluten Alkohol, dann in ein Gemisch von Alkohol und Chloroform zu gleichen Theilen, und sobald sie darin untergesunken sind, in reines Chloroform, dem sie bereits nach 3—15 Minuten das gleiche Volumen Paraffin hinzufügen; endlich zum Schmelzen des Paraffins in den Thermostaten bei 35—36° C. und nach 2 1/2—3 Stunden auf höchstens 5 Minuten in Paraffin, das bei 52° C. geschmolzen ist. (S. hierzu auch § 594 CORNING.) Die Schnitte färben sie mit ihrem Hämateïngemisch (ähnlich dem von Delafield, nur stärker) 1/2—2 Minuten lang und schliessen sie aus Cajeputöl in Kolophonium ein. Ueberfärbung corrigiren sie mit Jodwasser. Die ganzen Eier färben sie mit dem stark verdünnten Hämateïngemisch 24 Stunden lang. Doppelfärbungen mit Indigkarmin oder mit Congoroth (§ 321) etc. — S. auch CARNOY & LEBRUN (ibid. Tome 17 1900 p. 207) und oben p. 291.

591. Siredon. FICK (Zeit. Wiss. Z. 56. Bd. 1893 p. 529) fixirt die ganzen Eier 24 Stunden lang in Chromessigsäure (250 Th. 1 %ige Chromsäure, 750 Th. Wasser, 1 Th. Eisessig), präparirt die Hüllen ab, wäscht die Eier 24 Stunden lang in fliessendem Wasser und bringt sie auf je ebenso lange in 60 %igen und 80 %igen Alkohol. Dann Boraxkarmin, Einbettung aus Bergamottöl in Paraffin von 50° Schmelzpunkt (nur 1/2—1 Stunde lang). S. auch § 594.

592. Triton. SCOTT & OSBORN (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 19 1879 p. 449) schneiden die sehr zarten Gallertschichten um das Ei

eine nach der andern mit der Scheere durch, holen das Ei hervor und fixiren es mit Pikrinschwefelsäure als dem besten Mittel dafür. — HERTWIG (Jena. Zeit. Naturw. 15. Bd. 1881 p. 291) legt die Eier in ein Gemisch von „2 % Essigsäure und 0,5 % Chromsäure", schneidet 10 Stunden später die Hüllen durch, öffnet das innere Chorion an einem Ende, holt die Embryonen heraus und bringt sie in Alkohol von 70—90 %. S. auch § 594.

BRAUS (Jena. Zeit. Naturw. 29. Bd. 1894 p. 443) entfernt von den Eiern die Gallerte, indem er diese mit einer Insektennadel durchsticht, das Ei auf einem Stück Leber feststeckt und nun mit einem Rasirmesser die Gallerte so durchschneidet, dass das Ei hervortritt und direkt in das Fixirgemisch (Sublimatessigsäure nach Drüner, oben § 66) gelegt werden kann. Färbung der Schnitte mit Biondischem Gemisch nach Drüner (oben p. 215).

MICHAELIS (Arch. Mikr. Anat. 48. Bd. 1896 p. 528) fixirt die Eier sammt den Hüllen in einem Gemisch von konzentrirter Sublimatlösung und konzentrirter Pikrinsäurelösung je 20, Eisessig 1 und Wasser 40 Theilen, präparirt aber vor dem Einlegen in Alkohol die Hüllen ab. Färbung der Paraffinschnitte mit Eisenhämatoxylin.

593. Salamandra. S. RABL (Morph. Jahrb. 12. Bd. 1886 p. 252); seine neueren Methoden s. in § 578.

GRÖNROOS (Anat. Anzeiger 14. Bd. 1898 p. 461) fixirt die Eier mit einem Gemisch von gesättigter Sublimatlösung und $^1/_2$ %iger Chromsäure je 50 Theilen und Eisessig 1 Theil. Dies sei besonders gut für Oberflächenbilder.

594. Anuren. HERTWIG (Jena. Zeit. Naturw. 19. Bd. 1883 p. 249) bringt die Eier auf 5—10 Minuten in Wasser von 90—96° C., schneidet die Hüllen durch, holt die Eier heraus und härtet sie entweder in $^1/_2$ %iger Chromsäure (höchstens 12 Stunden lang) oder in Alkohol von 70, 80 und 90 %. — MORGAN (Development of the Frog's Egg. New York 1897 p. 171) schneidet die Eier einzeln aus dem Laich heraus, bringt sie auf 1—12 Stunden in eine gesättigte Lösung von Pikrinsäure in 70 %igem Alkohol, der mit 2 % Schwefelsäure versetzt ist, und von da erst in 70 %igen, dann in 80 %igen Alkohol. Darin schwillt die innere Hülle so an, dass man sie anstechen und das Ei herausholen kann. Zum Einbetten bringt sie Morgan nur auf 2—5 Stunden in absoluten Alkohol, dann auf 2 bis 5 Stunden in Terpentinöl, von da auf je $^1/_2$ Stunde in weiches und hartes (von 56—58° Schmelzpunkt) Paraffin und schneidet sie bei

24—26° C. (das Mikrotom stellt man eventuell in die Sonne); der Dotter ist dann nicht brüchig.

CORNING (Morph. Jahrb. 27. Bd. 1899 p. 174) fixirt die Embryonen in Rabls Pikrinsublimat (oben § 65), färbt sie mit Alauncochenille durch und bringt sie aus Chloroform erst in flüssiges Paraffin von 45°, dann in ein Gemisch von 52° und 56° Schmelzpunkt, lässt sie aber in jedem Bade nur 20 Minuten, damit der Dotter nicht brüchig werde.

SCHULTZE (Arch. Mikr. Anat. 55. Bd. 1899 p. 174) fixirt die Eier von *Rana* 5 Minuten lang in 2%igem heissem (75—80° C.) Formaldehyd, präparirt die Hülle ab, bringt die Eier auf mindestens je 2 Stunden in Alkohol von 70 und 95% und Bergamottöl, dann in warmes Paraffin auf 20 Minuten, das aber nach 10 Minuten durch frisches zu ersetzen ist. Die Eier lassen sich in den Hüllen in Formol Monate lang unverändert aufbewahren. — S. ferner WHITMAN, Methods p. 156 und SCHULTZE in: Zeit. Wiss. Z. 45. Bd. 1887 p. 185 (Eier von *Triton, Siredon, Rana* und *Bufo* 24 Stunden mit Flemmings Gemisch, gut ausgewaschen, dann Alkohol von 50—95%).

REMAK (Unters. Entwickl. Wirbelthiere Berlin 1855 p. 127) benutzt zur Erhärtung der Eier von *Rana* ein Gemisch von 6 Theilen Kupfersulfat, je 100 Th. Wasser und Alkohol von 20—30% nebst etwas Holzessig.

FOL gibt (Lehrb. p. 106) folgendes Gemisch (nach Remak und Götte) für Amphibieneier an: je 50 ccm einer 2%igen Lösung von Kupfersulfat und von 25%igem Alkohol, dazu 35 Tropfen rektifizirten Holzessig.

Ueber die Larven von *Rana* s. oben § 109e (BOUIN).

Fische.

595. Selachier. Man fixirt die Embryonen recht gut in gesättigter wässeriger Sublimatlösung ohne oder mit Essigsäure (5%) und bringt sie von da auf ganz kurze Zeit in Wasser, dann in Alkohol von 50, 70 und 90%. In letzterem behandelt man sie auch mit Jodjodkalium. Durchfärbung mit Hämalaun oder Karmalaun, Gegenfärbung der Schnitte mit Eosin, Lichtgrün, Indigkarmin oder Orange G.

Damit die älteren Embryonen sich möglichst gerade strecken, was zur Anfertigung guter Längsschnitte von Vortheil ist, schiebe ich (MAYER) sie, während sie gerade im Sterben begriffen sind, mit einem Pinsel oder Hornspatel vorsichtig mit dem Schwanz zuerst in den keilförmigen Raum zwischen 2 Glasklötzen, die in der Schale mit der Sublimatlösung bereit liegen, bis etwa zur Kiemenregion hinein.

Ueber die Methode von Rabl s. oben § 578.

Beobachtungen am lebenden Embryo lassen sich nach HIS (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. 1897 p. 3) und KASTSCHENKO (Anat. Anzeiger

3. Jahrg. 1888 p. 445) in der Art ausführen, dass man die Schale mit einem Messer bis zur Durchsichtigkeit abschabt.

596. Knochenfische. Die Eier mancher Knochenfische lassen sich lebendig bei durchfallendem Lichte beobachten.

Um Oberflächenbilder der Embryonen zu erhalten, legt VIRCHOW (s. Kopsch in: Arch. Mikr. Anat. 51. Bd. 1897 p. 184) die Embryonen von *Salmo* 5—10 Minuten lang in Chromessigsäure (Chromsäure 1, Eisessig 50, Wasser 450), bringt sie dann provisorisch in Chromsäure von 1 : 500, darauf in Salzwasser (0,7 bis 1 %), entfernt darin Eischale und Dotter und legt sie nun wieder in die Chromessigsäure oder in konzentrirte Sublimatlösung. S. auch § 597 (GORONOWITSCH).

KOWALEWSKI (Zeit. Wiss. Z. 48. Bd. 1886 p. 434) bringt die Eier auf 1¼ Stunde in ein Gemisch von 8 Vol. Pikrinschwefelsäure und 1 Vol. 1 %ige Chromsäure, dann auf 12 Stunden in öfters gewechselten Alkohol von 20 %, der in etwa 10 Stunden allmählich auf 70 % verstärkt wird. Vor dem Färben muss das Chorion entfernt werden. — SUMNER (Mem. New York Acad. Sc. Vol. 2 1900 p. 78) fixirt nach einer Methode von Child die Eier nur etwa 1 Minute lang mit saurer Sublimatlösung (10 % Essigsäure) und bringt sie dann in 10 %iges Formalin. So wird der Embryo gut fixirt und der Dotter nicht hart. — Ueber die Methode von Rabl s. oben § 578.

597. Salmoniden. HENNEGUY (Journ. Anat. Phys. Paris 24. Année 1888 p. 416) legt die Eier auf einige Minuten in 1—2 %ige Essigsäure, dann in 1 %ige Chromsäure, öffnet nach 3 Tagen die Kapsel an dem dem Embryo entgegengesetzten Ende und nimmt sie mit einer feinen Pincette fort. Darauf wäscht er das Ei 1 Tag lang mit Wasser und härtet es in Alkohol. Die Embryonen sind recht gut erhalten, nur der Dotter wird sehr brüchig. Zum Schneiden dagegen fixirt Henneguy die Eier in einem Gemisch von 10 Theilen Pikrinschwefelsäure und 1 Theil Essigsäure, öffnet sie 10 Minuten später unter 10 %iger Essigsäure, die den Dotter löst, bringt die Embryonen in reine Pikrinschwefelsäure und von da in immer stärkeren Alkohol.

HARRISON (Arch. Mikr. Anat. 46. Bd. 1895 p. 505) fixirt die Embryonen in einer gesättigten Lösung von Sublimat in 5 %iger Essigsäure; Färbung mit dem Hämatoxylingemisch von Delafield und nachher mit Pikrinsäure. — Aehnlich FELIX (Anat. Hefte 1. Abth. 8. Bd. 1897 p. 252): er fixirt die Eier mit Sublimat-Eisessig ¾ Stunden

lang, die abpräparirten Embryonen in Zenkers Gemisch (wobei er den Dotter aus der Bauchhöhle mit einem Pinsel entfernt). Färbung mit Boraxkarmin und Jodgrün (2 %ige Lösung in 50 %igem Alkohol). Erst kurz vor dem Einbetten kommen die Objekte in stärkeren als 80 %igen Alkohol.

Rabl-Rückhard (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1882 p. 118) fixirt die Eier 1/4 Stunde lang in 10%iger Salpetersäure, entfernt die Eihüllen, damit der Embryo nicht durch ihren Druck leide, bringt die Eier in die Säure zurück, wäscht sie 1 Stunde später mehrere Stunden lang mit einer 1—2%igen Alaunlösung und härtet sie in Alkohol. — Goronowitsch (Morph. Jahrb. 10. Bd. 1884 p. 381) ändert für Totalansichten der Embryonen diese Methode dahin ab, dass er die Eier auf etwa 3 Minuten in 5%ige Salpetersäure, dann auf 1 Stunde in 5%ige Alaunlösung legt, sie dann halbirt, um den Dotter sich im Alaun auflösen zu lassen, und nun die Keimscheiben in 10%iges Glycerin mit etwas Sublimat bringt. Für Schnitte hingegen verwendet er Pikrinschwefelsäure 3 Stunden lang, entfernt aber schon nach 10 Minuten das Chorion; später Alkohol von 40, 70, 90%. Einbettung in Paraffin.

Kollmann (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1885 p. 296) legt die Eier auf 12 Stunden in ein Gemisch von 5 Theilen Kaliumbichromat, 2 Theilen Chromsäure, 2 Theilen Salpetersäure und 100 Theilen Wasser, wäscht sie ebenso lange in Wasser, entfernt dann das Chorion und bringt die Eier in 70%igen Alkohol.

Böhm (Sitzungsb. Ges. Morph. Phys. München 7. Bd. 1891 p. 64) fixirt die Eier entweder mit Boveris Pikrinessigsäure (oben § 97) oder mit Sublimatessigsäure: erst auf 1/2 Minute in ein starkes Gemisch (4 Th. gesättigte Sublimatlösung und 1 Th. Essigsäure), dann in ein schwaches (mit nur 5 % Essigsäure) und nach etwa 3/4 Stunden in Alkohol von 70 %, endlich nach derselben Zeit in solchen von 80 %; vorher aber wird mit einem Rasirmesser der Embryo mit möglichst wenig Dotter vom Ei abgelöst.

Behrens (Anat. Hefte 1. Abth. 10. Bd. 1898 p. 233) bedient sich zunächst der Methode von Virchow (§ 596), fixirt aber dann die von Schale und Dotter befreiten Keimscheiben in Rabls Pikrinsublimat (oben § 65). Beim Einbetten aus Chloroform lässt er sie höchstens 1/2 Minute lang im warmen reinen Paraffin.

598. Pelagische Fischeier. Whitman (Amer. Natural. Vol. 17 1883 p. 1204; Methods p. 152) legt die Eier auf 5—10 Minuten in ein Gemisch von 1/2%iger Osmiumsäure und Seewasser zu gleichen Theilen, darauf in die Eisigsche Modifikation des Merkelschen Gemisches (oben § 71). Nach 1—2 Tagen sticht er die Eikapsel an und bringt nun das Ei in Alkohol. — Vergl. auch Agassiz & Whitman (Proc. Amer. Acad. Vol. 20 1884 p. 28).

Collinge (Ann. Mag. N. H. (6) Vol. 10 1892 p. 228) tödtet die Eier von marinen Teleostiern durch Zusatz von etwas gesättigter Pikrinsäurelösung, die

mit 5 % Salzsäure vermischt ist, zum Seewasser (zu 30 ccm 3 oder 4 Tropfen), lässt sie hierin höchstens 3 Minuten unter Umrühren, wäscht sie gut in Wasser und härtet sie in einem Gemisch von Kampherspiritus 1 Theil, 2%iger Essigsäure und Alkohol je 4 Theilen. (Collinge gibt noch mehrere andere Gemische an, empfiehlt aber selbst das obige als das beste.)

Raffaele (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1895 p. 169) fixirt die Eier hauptsächlich mit dem Gemisch von Hermann (1—3 Tage lang) oder von Mingazzini (oben § 62 d).

Nach Heincke & Ehrenbaum (Wiss. Meeresunt. Komm. Wiss. Unt. D. Meere (2) 3. Bd. Abth. Helgoland 1900 p. 205 u. 213) schrumpfen die Eier in Perényis Gemisch beträchtlich, dagegen so gut wie gar nicht in einem Gemisch von 1 Vol. Formol und 39 Vol. Seewasser.

599. Amphioxus. Nach Sobotta (Arch. Mikr. Anat. 50. Bd. 1897 p. 20) werden die Eier am besten in Flemmings Gemisch 24 Stunden lang fixirt. Ueber Färben etc. s. § 578 am Ende.

Mac Bride (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 40 1898 p. 593) hält zum Fixiren nur Osmiumsäure für brauchbar. Er bettet die Larven in Celloidin und Paraffin ein.

Tunikaten.

600. Eier. Davidoff (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1899 p. 118) fixirt die Eier von *Distaplia* in einem Gemisch von 3 Theilen konzentr. wässeriger Sublimatlösung und 1 Theil Eisessig $^1/_2$—1 Stunde lang, wäscht sie dann einige Minuten mit Wasser und bringt sie in immer stärkeren Alkohol. Beinahe so gut wirkt auch ein Gemisch von 3 Theilen gesättigter wässeriger Lösung von Pikrinsäure und 1 Theil Eisessig; hierin bleiben die Eier 3—4 Stunden und kommen dann direkt in 70 %igen Alkohol.

Morgan (Journ. Morph. Boston Vol. 4 1891 p. 195) zerzupft die Ovarien von Ascidien in schwacher Osmiumsäure, wäscht sie mit destillirtem Wasser, behandelt sie $^1/_2$ Stunde lang mit einer 1%igen Lösung von Höllenstein, ferner ebenso lange mit 2%iger Essigsäure und reduzirt am Licht. Hierdurch treten die Grenzen der Follikelzellen klar hervor.

Castle (Bull. Mus. Harvard Coll. Vol. 27 1896 p. 213) empfiehlt für die Eier von *Ciona* in erster Linie Perényis Gemisch (20 Minuten lang, dann Alkohol von 70% und nach 24 Stunden von 90%), für die Larven Pikrinsalpetersäure. Zum Färben dient am besten Orths Pikrolithionkarmin (6—24 Stunden lang, dann Wasser); die gefärbten Eier werden nach Chabry zur Sprengung der Hüllen in eine Kapillare aufgesaugt, die gerade weit genug ist, um sie nackt durch zu lassen. Dann Einschluss in Balsam; eventuell wird dieser durch Xylol wieder entfernt und das in toto studirte Ei in einem mit Glycerin bestrichenen Uhrglas 15—20 Minuten lang mit flüssigem Paraffin behandelt. Nachfärbung der Schnitte mit Ehrlichs Hämatoxylingemisch.

601. Knospen. Pizon (Ann. Sc. N. (7) Tome 14 1893 p. 5) studirt die Knospung bei den zusammengesetzten Ascidien entweder an den ganzen Stöcken, die er vorher mit Wasserstoffhyperoxyd bleicht (dieses wirkt nicht so roh wie Eau de Javelle, man muss aber die Luftblasen mit der Luftpumpe entfernen) und dann färbt, oder auf Schnitten nach Betäubung der Kolonien mit Cocaïn (1 : 1000), Fixirung in Eisessig, Pikrinschwefelsäure oder Flemmingschem Gemisch und Färbung in toto mit Borax- (oder Alaun)-karmin und Methylenblau (sehr starke Lösung in Alkohol von 90 und 100 %) nach Bernard (s. unten § 830).

Ritter (Journ. Morph. Boston Vol. 12 1896 p. 150) empfiehlt zum Fixiren von *Perophora* und *Goodsiria* besonders Pikrinschwefelsäure.

Bryozoen.

602. Statoblasten. Braem (Bibl. Z. Chun & Leuckart 6. Heft 1890 p. 85) fixirt die Statoblasten von *Cristatella*, um die Entwickelung der Embryonen zu untersuchen, mit heisser konzentr. Lösung von Sublimat, bringt sie nach 10 Minuten in Wasser, schneidet sie mit dem Rasirmesser an und führt sie 1 Stunde später allmählich in Alkohol von 96 % über. Färbung mit Pikrokarmin.

Mollusken.

603. Cephalopoden. Ussow (Arch. Biol. Tome 2 1881 p. 582) legt die Eier in Furchung, ohne die Hüllen zu entfernen, auf 2 Minuten in 2 %ige Chromsäure, dann ebenso lange in destill. Wasser mit einer Spur Essigsäure (1 Tropfen auf ein Uhrglas voll). Macht man nun in die Hülle einen Schnitt, so fliesst der Dotter aus; sollte noch etwas davon am Blastoderm kleben, so ersetzt man das Wasser durch frisches.

Watasé (Journ. Morph. Boston Vol. 4 1891 p. 249) tödtet die Eier in dem Macerirgemisch von Hertwig (§ 527), löst das Blastoderm, sobald es undurchsichtig wird, los und bringt es in verdünntes Glycerin. Für Oberflächenbilder der Furchung empfiehlt er Perényis Gemisch.

Vialleton (Ann. Sc. N. (7) Tome 6 1887 p. 168) bringt die Eierstockseier von *Sepia* in ein frisches Gemisch gleicher Theile Pikrinschwefelsäure und $2\frac{1}{2}$ %iger Lösung von Kaliumbichromat, schneidet sie nach 1—2 Minuten im Aequator durch, fixirt die Hälfte, die den Bildungsdotter enthält, $1\frac{1}{2}$ Stunde lang in Pikrinschwefelsäure, hebt diesen mit einem Spatel vom Nahrungsdotter ab, breitet

ihn flach aus und härtet ihn in Alkohol von 70—90 %. Ganze Eier fixirt er zum Schneiden in Flemmings Gemisch oder Osmiumsäure. In älteren Eiern lässt sich das Blastoderm direkt in Pikrinschwefelsäure vom Dotter loslösen.

KORSCHELT (Festschrift Leuckart Leipzig 1892 p. 348) konservirt die älteren Embryonen von *Loligo* in Flemmings Gemisch, Sublimat, Pikrinschwefelsäure oder $^1/_5$ %iger Chromsäure. Letztere ist für jüngere Embryonen besonders gut, wenn man sie hinterher durch Pikrinsäure, die oft gewechselt wird, auswäscht.

FAUSSEK (Mitth. Z. Stat. Neapel 14. Bd. 1900 p. 88) braucht zum Fixiren meist Perényis Gemisch und Sublimatlösung (ohne oder mit Essigsäure), besonders aber Pikrinsalpetersäure. Aus letzterer kommen die einigermaassen von der Gallerte befreiten Eier in Alkohol, dann in Hämalaun, von da in 1 %ige Alaunlösung, und nun lässt sich die Gallerte ohne grosse Mühe ganz entfernen. Färbung auch mit Karmalaun oder Boraxkarmin. Beim Schneiden muss wegen des bröckligen Dotters der Block mit Kollodium bestrichen werden.

604. Gastropoden. HENNEGUY (Lee & Henneguy, Traité 2. Ed. 1896 p. 346) legt die Eier von *Helix* auf 4—6 Stunden in Pikrinsalpetersäure (s. oben § 93), löst so den Kalk in der äusseren Hülle auf und koagulirt die Eiweissschicht des Eies. Nun öffnet er das Ei mit Nadeln, nimmt das Eiweiss stückweise weg und legt den Embryo frei. Darauf Alkohol etc. bis Paraffin.

HENCHMAN (Bull. Mus. Harvard Coll. Vol. 20 1890 p. 172; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 216) tödtet die Eier mit $^1/_8$ %iger Chromsäure oder mit Perényis Gemisch. Verwendet man jene, so entfernt man vorher nur die äussere Hülle und erst einige Minuten später unter der Säure auch die innere; sonst jedoch muss man beide wegnehmen, denn in P.s Gemisch koagulirt das Eiweiss so stark, dass man die Embryonen nicht frei machen kann.

MEISENHEIMER (Zeit. Wiss. Z. 62. Bd. 1896 p. 417) legt die Embryonen von *Limax* mit Nadel und Messer frei und fixirt sie dann mit Pikrinschwefelsäure oder konzentrirter Sublimatlösung. Aeltere Embryonen streckt er vorher durch 2 %ige Cocaïnlösung oder direkt durch heisse Sublimatlösung. Einbettung aus Chloroform in Paraffin (54—56° C.) sehr vorsichtig, um Schrumpfungen zu vermeiden.

KOSTANECKI & WIERZEJSKI (Arch. Mikr. Anat. 47. Bd. 1896 p. 313) fixiren den Laich von *Physa* entweder mit $1^1/_2$—2 %iger Salpeter-

säure oder in „Sublimat und 3 % Salpetersäure (im Verhältniss 2 : 1)“ und bringen ihn dann in Alkohol von 30—100 %. Den Laich betten sie in Paraffin, die isolirten Embryonen dagegen in Celloidin ein. Ueber die Färbung s. oben p. 170.

SCHMIDT (Entwicklungsgesch. Pulmonaten Dorpat 1891 p. 4) fixirt die ganzen Eier mit konzentr. Sublimatlösung (10—15 Minuten), präparirt nach längerem Waschen mit destill. Wasser die Embryonen heraus und behandelt sie wie gewöhnlich weiter.

Dieser Methode bedient sich auch KOFOID (Bull. Mus. Harvard Coll. Vol. 27 1895 p. 35), hält aber die folgende für besser: man legt die Eier in Normalsalzwasser (0.75 %), entfernt die Schale und mit einer Pipette voll Salzwasser das Eiweiss, das sich in dem Wasser löst; jedoch muss man rasch verfahren, da das Wasser doch die Kerne etwas angreift. Nun kommen die Eier in das Fixirgemisch, am besten in Fols Modifikation von Flemmings Gemisch, auf 1 Minute, darauf direkt in Orths Pikrolithionkarmin und 12—24 Stunden später in sauren Alkohol (von 90 % mit 5 % Salzsäure).

WASHBURN (Amer. Natural. Vol. 28 1894 p. 528) fixirt die abgelegten Eier von *Limax* 5 Minuten lang in Flemmings Chromessigsäure, entfernt unter Wasser die Hülle, legt darauf den Dotter wieder auf 5 Minuten in die Lösung, auf 10 Minuten in Wasser, dann in Alkohol von 35, 50, 70 und 90 %. Oder ähnliche Behandlung mit $^{1}/_{3}$ %iger Chromsäure, oder: auf 5 Minuten in 1 %ige Osmiumsäure, dann auf 4 Stunden in Merkels Gemisch, darauf die Hülle entfernt, das Ei in Wasser gewaschen und wie oben in Alkohol. Um jüngere Eier zu erhalten, schneidet W. ein trächtiges Thier auf, wirft es sofort auf 1 Minute in heisse Sublimatlösung, holt unter Wasser die Eier heraus und entfernt die Hülle, dann Alkohol von 35, 50 und 70 %.

CONKLIN (Journ. Morph. Boston Vol. 13 1897 p. 7) fixirt für Oberflächenbilder die Eier von *Crepidula* in Pikrinschwefelsäure 15—30 Minuten lang und färbt sie mit verdünntem, leicht mit Salzsäure angesäuertem Delafieldschem Hämateïngemisch. Auch für Paraffinschnitte ist Pikrinschwefelsäure im Allgemeinen gut; Färbung der Schnitte mit Delafields Gemisch und einer Lösung von Erythrosin in Anilinwasser.

HOLMES (ibid. Vol. 16 1900 p. 371) zerzupft die Eikapseln von *Planorbis* in einer $^{3}/_{4}$ %igen Lösung von Silbernitrat, setzt sie darin so lange der Sonne aus, bis die Zellgrenzen gut hervortreten, spült sie einen Augenblick mit Natriumhyposulfit ($^{1}/_{5}$ % in destill. Wasser) ab, bringt sie auf einige Minuten in eine starke wässerige Lösung von Pikrinsäure und von da allmählich in Balsam. Eine besondere Färbung der Kerne ist unnöthig.

CARAZZI (Anat. Anzeiger 17. Bd. 1900 p. 78) fixirt die Eischnüre von *Aplysia* mit Sublimat (5 % in Wasser, dazu $2^{1}/_{2}$ % Essigsäure), bringt sie erst in Wasser, dann in Alkohol (ohne Jod!), zerzupft sie, färbt die Eier mit Hämalaun und führt sie durch Cedernöl und Xylol in Balsam über. Um die Zellgrenzen schärfer

zu erhalten, benutzt er zum Fixiren ein mit Essigsäure versetztes Rablsches Pikrinsublimat. Das Gemisch von Perényi und Boveris Pikrinessigsäure geben keine guten Resultate.

605. Chiton. Metcalf (Stud. Biol. Lab. J. Hopkins Univ. Baltimore Vol. 5 1893 p. 251) empfiehlt zum Fixiren besonders eine wässerige Lösung von Pikrinsäure in Salzwasser vom spezif. Gewicht des Seewassers. Die Eier mit ganz jungen Embryonen legt er auf 20—45 Sekunden in Eau de Labarraque, dann in Wasser, worin das Chorion anschwillt und leicht entfernt werden kann; bleiben die Eier etwas länger in jener Lösung, so wird auch der Dotter aus den Zellen völlig aufgelöst, während Plasma und Kern ziemlich intakt bleiben.

606. Lamellibranchiaten. Stauffacher (Jena. Zeit. Naturw. 28. Bd. 1893 p. 196) fixirt die Embryonen von *Cyclas* in Sublimat, färbt sie mit Hämalaun und bettet sie in Paraffin ein. — Lillie (Journ. Morph. Boston Vol. 20 1895 p. 7) bringt die Eier von *Unio* auf 10—20 Minuten in Perényis Gemisch, wäscht sie und hebt sie in Alkohol von 70 %, auf. Nach 3—4 Monaten legt er sie ungefärbt in 50 %iges Glycerin und lässt dieses sich durch Verdunsten des Wassers langsam konzentriren; oder er legt die Eier direkt aus dem Fixirgemisch in 50 %iges Glycerin und färbt sie mit Schneiders Essigkarmin. Aeltere Embryonen fixirt er mit Merkels Gemisch oder mit Sublimat, Larven behandelt er mit Osmiumsäure ($^1/_{10}$—$^1/_{20}$ %) und legt sie dann in Glycerin ein. Die Glochidien lassen sich mit den Schalen in hartem Paraffin (58°) schneiden; vor dem Fixiren werden sie mit Chloralhydrat betäubt.

Arthropoden.

607. Fixiren der Eier. Meist lassen sich die Eier durch Hitze besser fixiren als sonst wie. Dann lässt man entweder Alkohol oder ein wässeriges Härtmittel folgen. Will man Hitze vermeiden, so nehme man Pikrinsalpetersäure.

608. Insekten. Henking (Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 156) tödtet die Eier durch Eintauchen in heisses Wasser oder Zugiessen von heissem Wasser zu ihnen und bringt sie dann in 70 %igen Alkohol, findet aber die feinere Struktur nicht besonders gut erhalten. In einigen Fällen gibt Flemmings Gemisch sehr viel bessere Resultate: man legt die Eier auf $^1/_2$ Stunde hinein, dann auf zwei Stunden in das mit dem dreifachen Volumen verdünnte Gemisch und behandelt sie zuletzt wie gebräuchlich mit Alkohol. Die Pikrin-

essigsäure von Boveri (§ 97) dringt nicht durch die Eihülle ein. Die Eau de Javelle vermeidet man lieber ganz und entfernt entweder die Hüllen mechanisch oder lässt sie um das Ei und schneidet sie mit, je nachdem es besser geht. Am meisten Schwierigkeiten macht beim Schneiden der Dotter, aber man kann sie wie folgt vermeiden: man fixirt das Ei, bringt es in Alkohol, dann in Boraxkarmin (man muss das Chorion anstechen, sonst dringt das Karmin nicht ein), daraus auf 12 Stunden in sauren Alkohol von 70 % (20 ccm mit einem Tropfen Salzsäure und einer Messerspitze voll Pepsin), endlich durch Bergamottöl in Paraffin, worin sie sich (mit einigen Ausnahmen, z. B. *Bombyx mori*) ohne dass der Dotter krümelt, schneiden lassen. Um den Inhalt frischer Eier zu studiren, zerzupft Henking sie in einem eigenen Gemisch (s. oben § 422.)

609. Lepidopteren. Bobretzky (Zeit. Wiss. Z. 31. Bd. 1878 p. 198) erwärmt die Eier ein wenig in Wasser, bringt sie auf 14—20 Stunden in $^1/_2$%ige Chromsäure, entfernt dann das Chorion, legt sie auf einige Stunden in Alkohol, färbt sie mit Karmin und schneidet sie.

610. Dipteren. Henking (Zeit. Wiss. Z. 46. Bd. 1888 p. 289) fixirt die Eier im Mutterleibe durch heisses Wasser, schneidet sie dann heraus und härtet sie in Alkohol von 70 %. Die abgelegten Eier fixirt er durch Uebergiessen mit heissem Wasser oder dadurch, dass er sie mit Flemmingschem Gemisch in ein Reagensglas bringt, das er auf etwa 1 Minute in heisses Wasser taucht, bis die Eier sich schwärzen. (Kaltes Gemisch ruft leicht Vacuolen in den Eiern hervor.) Er sticht die Eier dann am stumpfen Pole an, färbt sie mit Boraxkarmin 15—30 Stunden lang und bettet sie in Paraffin ein. — Ritter (Zeit. Wiss. Z. 50. Bd. 1890 p. 408) fixirt die Eischnüre von *Chironomus* mit heissem 30 %igem Alkohol, worin etwas Sublimat gelöst ist, und färbt sie mit Pikrokarmin.

Brüel (Z. Jahrb. Abth. Morph. 10. Bd. 1897 p. 569) benutzt zum Konserviren der Larven und Puppen heissen (70—75 ° C.) absol. Alkohol „mit etwas Sublimatzusatz“; aber der Alkohol müsse auch wirklich absolut sein, da schon 99 %iger oft empfindliche Schrumpfungen bewirke. — S. auch van Rees (ibid. 3. Bd. 1888 p. 10).

Bengtsson (Handl. Fysiogr. Sällsk. Lund (2) 8. Bd. 1897) findet für die Dipterenlarve *Phalacrocera* zum Fixiren weitaus am besten heissen Sublimat-

alkohol nach Frenzel (oben § 64). Die Eau de Javelle zum Erweichen des Chitins hat stets versagt.

PANTEL (La Cellule Tome 15 1898 p. 80) betäubt die Larve von *Thrixion* in Salzwasser und Chloroform und bringt sie dann auf einen Augenblick in heisses Wasser. Zur weiteren Behandlung findet er besonders gut den sauren Sublimatalkohol nach Apáthy (2 %ige Lösung von Sublimat in 40 %igem Alkohol mit 5 % Essigsäure).

611. Hymenopteren. CARRIÈRE & BÜRGER (Nova Acta Acad. Leop. Car. 69. Bd. 1897 p. 273) tödten die Eier von *Chalicodoma* durch Erwärmen in Wasser bis auf 60° C. und fixiren sie dann entweder in wässeriger Pikrinsäure oder 70 %igem Alkohol.

612. Coleopteren. LÉCAILLON (Arch. Anat. Micr. Paris Tome 1 1897 p. 208) fixirt die Eier mit Zenkers Gemisch (assez fortement acidulé par l'acide acétique) bei 40° C. 24 Stunden lang und färbt die Schnitte mit Hämalaun. — Neuerdings (Recherches sur l'oeuf. Thèse Paris 1898 p. 39) fixirt er sie mit Zenkers Gemisch 12 Stunden lang bei 45° C., wäscht sie mit Wasser und bringt sie von 30 %igem Alkohol allmählich in 70 %igen. (Das Epichorion muss jedoch bei *Chrysomela* vorher durch Eintauchen der Eier in Eau de Javelle und bei *Agelastica* durch „huile de naphte" entfernt werden.) Zum Einbetten aus Xylol dient warmes Paraffin von 45° C.; die Eier kommen dann nur auf 1 Minute in solches von 55° C. Färbung mit Hämalaun.

KARAWAIEW (Biol. Centralbl. 19. Bd. 1899 p. 124) tödtet die Larven von *Anobium* durch heisses Wasser (80° C., nur einige Sekunden!), lässt sie sofort durch Aetherspray gefrieren, schneidet seitlich mit einem Messer einen Streifen fort, damit das Fixirgemisch besser eindringe, lässt sie aufthauen und bringt sie auf 24 Stunden in Pikrinschwefelsäure.

DEEGENER (Zeit. Wiss. Z. 68. Bd. 1900 p. 116) fixirt die Eier von *Hydrophilus* in heisser 1/2 %iger Chromsäure oder Pikrinschwefelsäure einige Minuten lang und härtet sie 12 Stunden in dem kalten Medium weiter. Auch Alkohol von 90 %, auf 30° C. erwärmt, ist gut; für ältere Stadien gesättigte Lösung von Sublimat in Wasser (heiss) oder in Alkohol von 60° (kalt). Aehnlich werden die Larven und Puppen behandelt.

613. Blattiden. PATTEN (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 24 1884 p. 549) bringt die Eier oder Larven in kaltes Wasser, erhitzt dieses allmählich bis auf 80° und legt sie nach dem Erkalten erst in Alkohol von 20 %, dann allmählich in immer stärkeren. — WHEELER (Journ. Morph. Boston Vol. 3 1889 p. 292) schneidet die Eier aus den Ovarien unter Salzwasser heraus, fixirt sie 1/4 Stunde lang in Perényis Gemisch, dann in Alkohol. Die abgelegten Eier tödtet er entweder nach Patten

durch Erhitzen, zerstört dann mit einer Pincette vorsichtig die Kapsel, holt die Eier heraus und härtet sie nach Belieben; oder er legt die Kapsel auf 10 Minuten in Pikrinschwefelsäure von 80° C. und daraus in 70 %igen Alkohol. Dieser bringt die Wände der Kapsel zum Quellen, sodass sie leichter entfernt werden kann. — HEYMONS (Zeit. Wiss. Z. 53. Bd. 1891 p. 434) schneidet die Kapsel an dem einen Ende auf, legt sie auf 2 Minuten in Wasser von 90° C. und öffnet sie in Chromosmiumessigsäure. Für Larven nimmt er entweder dieses Gemisch oder Sublimat.

MORGAN (Amer. Natural. Vol. 22 1888 p. 357; Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 69) empfiehlt für *Periplaneta*, Eau de Labarraque, auf $^1/_5$—$^1/_8$ verdünnt und leicht erwärmt, $^1/_2$—1 Stunde auf die lebenden Eier einwirken zu lassen; die Kapseln werden dann weich genug. Mit schon fixirten Eiern geht dies nicht so rasch. Natürlich darf die Flüssigkeit nicht in das Ei eindringen.

614. Phalangiden. HENKING (Zeit. Wiss. Z. 45. Bd. 1886 p. 86) fixirt die Eier mit heissem Wasser oder Flemmingschem Gemisch und härtet sie in 90 %igem Alkohol, bringt sie dann aber in 70 %igen zurück; hierdurch schwillt das Chorion an und kann leicht mit Nadeln entfernt werden.

615. Spinnen. KISHINOUYE (Journ. Coll. Sc. Japan Vol. 4 1891 p. 56; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 215) fixirt die Furchungsstadien durch kochendes Wasser, ältere Stadien durch Erwärmen in Wasser bis auf 70—80° C., bringt sie nach dem Erkalten in Alkohol von 70 %, sticht 24 Stunden später die nicht geplatzten Eihüllen mit einer Nadel an und härtet mit stärkerem Alkohol nach. Waren die Embryonen mit Pikrokarmin gefärbt, so drang das Paraffin besser ein. — Auch LOCY (Bull. Mus. Harvard Coll. Vol. 12 1885 p. 64; Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 242) verwendet zum Fixiren heisses Wasser; zum Durchfärben dient am besten Boraxkarmin nach Grenacher.

616. Skorpioniden. BRAUER (Zeit. Wiss. Z. 57. Bd. 1894 p. 405) fixirt die dem lebenden *Euscorpius* entnommenen Ovarialröhren, wenn die Eier noch klein sind, $^1/_2$—1 Stunde lang in kaltem Flemmingschem Gemisch und präparirt dann die Eier heraus; die mit älteren Embryonen bringt er entweder auf 24 Stunden in $^1/_5$ %ige Chromsäure oder erst auf 1—1$^1/_2$ Minute in fast kochendes Wasser, dann auf 2—6 Stunden in Chromessigsäure oder auf 10—20 Minuten in Flemmings Gemisch; bei den mit Wasser getödteten entfernt er aber sofort im Härtgemisch das Epithel der Ovarialröhren. Die Konservirung mit Chromsäure eignet sich nur für Oberflächenbilder.

617. Tardigraden. Erlanger (Morph. Jahrb. 22. Bd. 1895 p. 493) fixirt die Eier von Tardigraden (und diese selber) theils in Flemmings Gemisch, theils in Pikrinschwefelsäure, der auf jeden ccm 1 Tropfen 1%iger Osmiumsäure zugesetzt war, theils in Sublimatessigsäure (konzentrirte Sublimatlösung mit 20% Eisessig). In den beiden ersten Gemischen wurden die Eier aber so schwarz, dass sie mit Wasserstoffhyperoxyd in der Wärme gebleicht werden mussten. Die Kerne färbten sich nie scharf, was Verf. auf ihre grosse Armuth an Chromatin zurückführen möchte. Die ganzen Embryonen kamen meist ungefärbt in Glycerin, die Paraffinschnitte wurden nachgefärbt.

618. Peripatus. Kennel (Arb. Z. Inst. Würzburg 7. Bd. 1885 p. 114) fixirt die Embryonen (die ganz jungen Stadien mit dem Uterus) in Sublimatlösung oder 1/2—1%iger Osmiumsäure. — Sheldon (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 28 1887 p. 207) verwendet Sublimatlösung mit 33%iger Essigsäure entweder kalt oder warm und färbt dann gleich mit Pikrokarmin. Später (ibid. Vol. 29 1888 p. 283) nimmt sie aber ein Gemisch aus gleichen Theilen 1/2%iger Chromsäure und 2%iger Essigsäure; nachher Alkohol und Pikrokarmin.

619. Limulus. Kingsley (Journ. Morph. Boston Vol. 7 1892 p. 38) erhitzt die Eier in Seewasser auf 70—75° C. und bringt sie dann in Alkohol von 30—70%; in frühen Stadien bezeichnet er die Lage des Embryos auf dem Chorion mit Tusche, die sich in Alkohol hält. Wegen der Härte des Dotters müssen solche Stadien in Celloidin eingebettet werden, später geht es mit Paraffin. — Kishinouye (Journ. Coll. Sc. Japan Vol. 5 1893 p. 56) tödtet die Eier in Wasser von 60—70° C., bringt sie erkaltet direkt in Alkohol von 70%, sticht nach 1—2 Tagen das Chorion an und härtet sie weiter in stärkerem Alkohol. Durchfärbung mit Boraxkarmin oder einem Hämateïnthonerdegemisch. Sehr gute Schnitte ergibt die Einbettung in Celloidin-Paraffin.

620. Dekapoden. Reichenbach (Abh. Senckenberg. Ges. Frankfurt 14. Bd. 1886 p. 2; Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 400) erwärmt die Eier von *Astacus* langsam auf 60—70° C. (das Chorion platzt zuweilen, aber das schadet nicht), härtet sie dann 24 Stunden lang in Kaliumbichromat (1—2%) oder in Chromsäure (1/2%), wäscht sie ebenso lange mit Wasser aus und bringt sie in Alkohol von 70 und 100%.

Herrick (Bull. U. S. Fish Comm. Vol. 15 1896 p. 226) tödtet die Eier in heissem Wasser, schält sie ab, fixirt sie in Pikrinschwefelsäure und färbt sie später mit Boraxkarmin. — Waite (Bull. Mus. Harvard Coll. Vol. 35 1899 p. 155) fixirt die Eier von *Homarus*, wenn auch der Dotter geschnitten werden soll, 45—90 Minuten lang in Flemmings schwachem Gemisch, oder 60—90 Min. in Pikrin-

schwefelsäure; soll aber nur der Embryo studirt werden, so ist heisses Wasser oder Sublimatlösung (kalt oder heiss) zu nehmen.

Ueber Fixirung mit Salpetersäure s. oben p. 37, mit Pikrinsalpetersäure p. 57.

621. Amphipoden. DELLA VALLE (Fauna Flora Golf. Neapel 20. Monogr. 1893 p. 170) gibt die Eier von *Orchestia* mit einer Pipette in kochende, kalt konzentrirte wässerige Sublimatlösung, saugt sie sofort wieder heraus, bringt sie in Seewasser und von da in schwachen Alkohol. Das Chorion platzt entweder von selbst oder auf einen Stich mit einer Nadel, sodass der Jodalkohol etc. leicht eindringen können.

Nach LANGENBECK (Journ. Morph. Boston Vol. 14 1898 p. 303) quellen die Eier von *Microdeutopus* in Sublimat; am besten ist für sie die mit Seewasser bereitete Pikrinschwefelsäure: sie schrumpfen zwar sehr darin, aber ohne Verzerrung.

622. Isopoden. MC MURRICH (Journ. Morph. Boston Vol. 11 1895 p. 65) verwendet zum Fixiren der Eier von *Jaera* eine gesättigte Lösung von Pikrinsäure in 70 % igem Alkohol, der 2 Volumprozente konzentrirter Schwefelsäure zugesetzt werden, und zum Färben Kleinenbergs Hämatoxylingemisch. Ist der Dotter sehr brüchig, so bettet M. in Celloidin, sonst in Paraffin ein.

623. Cladoceren. Zum Studium der Entwickelung von *Leptodora* überschüttet SAMTER (Zeit. Wiss. Z. 68. Bd. 1900 p. 176) die ♀ (aber immer nur je 2 oder 3) mit warmer (etwa 30° C.) Sublimatlösung, welche „5—10%igen Alkohol enthält“, sticht die sofort aus dem Brutraum mit einer Pipette herausgeholten Eier an und bringt sie in „eine alkoholische Sublimatlösung von 15—20% bei gleichem Wärmegrade“. Alle 10 Minuten etwa setzt er etwas Alkohol zu, sodass in etwa 1 Stunde die Eier einer „50%igen alkoholischen Sublimatlösung“ sind; hieraus gelangen sie in 50%igen und allmählich in 100%igen Alkohol. Von da mit dem Dialysator von Schulze (oben § 3) in Benzol, dann in warmes Paraffin von 30° Schmelzpunkt und zuletzt in solches von 63° „im Augenblick der Erstarrung desselben“. (Ueber die Orientirung s. oben § 142.)

624. Copepoden. HÄCKER (Arch. Mikr. Anat. 49. Bd. 1897 p. 86) fixirt die Eisäcke von *Cyclops* 10 Minuten lang in Pikrinplatinosmiumessigsäure nach vom Rath (oben § 98).

PEDASCHENKO (Trav. Soc. Natural. Petersbourg Vol. 26 Livr. 4 No. 7 1898 p. 1) fixirt die Eisäcke von *Lernaea* theils in Sublimat mit Essigsäure, theils in Perényis Gemisch, theils (die ganz jungen Stadien) in absolutem Alkohol mit 25 % Essigsäure.

Würmer.

625. Polychäten. WILSON (Journ. Morph. Boston Vol. 6 1892 p. 373) färbt die lebenden Embryonen von *Nereis* durch Zusatz von Methylenblau zum Seewasser und sieht so die Zellgrenzen und das Plasma deutlicher. Zum Fixiren verwendet er besonders Flemmings und Perényis Gemisch 10—30 Minuten lang; Pikrinschwefelsäure ist nicht gut, dagegen sehr brauchbar Sublimateisessig nach Lang; die beiden letzten Gemische wirken also umgekehrt wie nach WISTINGHAUSEN (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1891 p. 47). Um die Eier in toto zu studiren, tödtet und konservirt er sie in einem Gemisch gleicher Theile von Glycerin, Wasser und Essigsäure und färbt davon nach Bedarf in Schneiders Essigsäurekarmin (etwa 3—5 Minuten lang), worauf er sie nach gutem Auswaschen mit demselben Glyceringemisch bald untersucht, ehe sie zu sehr nachdunkeln. — WISTINGHAUSEN (l. c.) erhält bei älteren Embryonen von *Nereis* die besten Resultate durch einstündiges Fixiren mit einem modifizirten Flemmingschen Gemisch (1 % ige Osmiumsäure 1—$1^1/_2$, 1 % ige Chromsäure 25, 2 % ige Essigsäure 5, Wasser 70 Raumtheile), 24 stündiges Auswaschen in Wasser und Uebertragen in Alkohol von 50 % (3 Stunden) und 70 %.

KORSCHELT (Zeit. Wiss. Z. 60. Bd. p. 545) findet für die Eier von *Ophryotrocha* die Pikrinessigsäure von Boveri (oben § 97) am geeignetsten: 3—4 Stunden lang, dann Alkohol von 70 % und 96 %. — Aehnlich MEAD (Journ. Morph. Boston Vol. 14 1898 p. 193) für *Chaetopterus*.

KLEINENBERG (Zeit. Wiss. Z. 44. Bd. 1886 p. 25) fixirt die Larven von *Lopadorhynchus* mit seiner Pikrinschwefelsäure, bringt sie direkt in Alkohol von 70 %, dann von 90 % und färbt sie mit Boraxkarmin nach Mayer (§ 232); in Folge dieser scharfen Kernfärbung lassen sie sich beim Einbetten bequem orientiren. Ferner (ibid. p. 36) macerirt er sie 1—2 Stunden lang in verdünnter Pikrinschwefelsäure und nachher mehrere bis 24 Stunden lang in Beales Karmin; die Zellen lassen sich dann leicht isoliren.

MEYER (Mitth. Z. Stat. Neapel 14. Bd. 1901 p. 252, 263 u. 293) wendet dagegen theils das Gemisch von Kupfersulfat und Sublimat (oben § 79), theils Sublimat oder Pikrinsäure mit Essigsäure (auf 3 Theile der gesättigten Lösung 1 Theil) an. Die Larven von *Lopad.* färbt er (p. 294) erst mit Boraxkarmin, dann nach dem Auswaschen in saurem Alkohol mit verdünntem Hämalaun (also ähnlich wie Mac Bride, s. unten § 859).

EISIG (Mitth. Z. Stat. Neapel 13. Bd. 1898 p. 89) fixirt die Eier und Larven von *Capitella* mit Sublimat (5 % in Seewasser gelöst; hiervon 3 Theile unmittelbar vor dem Gebrauch zu mischen mit

1 Theil Essigsäure); eventuell müssen die Larven vorher mit Cocaïn betäubt werden (2 % in Seewasser; der Niederschlag mit Sublimat löst sich später in Alkohol wieder auf). Dann Alkohol von 50, 70, 90 %. Zum Färben dient, da wässerige Mittel schädlich sind, Hämacalcium (aber mit 5 % Essigsäure statt mit 2 %), und die Ueberfärbung wird durch langes Verweilen der Eier in 70 %igem Alkohol mit 2 % Aluminiumnitrat korrigirt. Einschluss aus Cedernöl in Xylol- oder Cedernölbalsam. Nachfärbung der Schnitte mit Eosin in 90 %igem Alkohol.

626. Hirudineen. Nach Apáthy (Carazzi, Manuale p. 214) fixirt man die Eier von *Clepsine* am besten 12—14 Stunden lang mit einem Gemisch gleicher Theile von gesättigter wässeriger Sublimatlösung, ebensolcher Pikrinsäurelösung und 15 %iger Essigsäure, bringt sie dann direkt auf 24 Stunden in Alkohol von 96 % und nach derselben Zeit in Alkohol mit Jodjodkalium. (Bei *Hirudo, Pontobdella* etc. muss man aber zu allererst die Eikapsel öffnen und das Eiweiss entfernen.) — Ferner ist gut das Gemisch von Osmiumsäure und Sublimat (oben § 375) und für Oberflächenbilder entweder Carnoys Alkohol mit Essigsäure (oben § 82) oder gesättigte wässerige Sublimatlösung mit 20 % Essigsäure; nach 1/4 Stunde Uebertragung in alkoholische Sublimatlösung, Alkohol etc.; Färbung mit Parakarmin. Aeltere Embryonen von Clepsiniden fixirt man mit Sublimat und ganz wenig (1 ‰) Osmiumsäure.

627. Myzostoma. Wheeler (Arch. Biol. Tome 15 1897 p. 2) presst die Eier mit einer stumpfen Nadel aus dem Thier heraus und behandelt sie entweder mit Schneiders Essigsäurekarmin oder (für Schnitte) mit schwachem Flemmingschem Gemisch. Setzt man dieses vorsichtig zu dem Seewasser mit den Eiern, so kleben sie am Boden des Uhrglases fest und lassen sich so auf dem gebräuchlichen Wege in Paraffin einbetten. — Nach Kostanecki (Arch. Mikr. Anat. 51. Bd. 1898 p. 463) ist zum Fixiren Perényis Gemisch am besten, weniger gut die 3 %ige Salpetersäure.

Häcker (*Zellen- und Befruchtungslehre Jena 1899; Zeit. Wiss. Mikr. 17. Bd. 1900 p. 51) fixirt die Eier in kleinen Näpfen der Alge *Ulva*, damit sie beisammen bleiben und weiter behandelt werden können; als Fixirmittel dienen Flemmings oder Raths Gemisch.

628. Rotatorien. Jennings (Bull. Mus. Harvard Coll. Vol. 30 1896 p. 101) verwendet zum Fixiren der trächtigen Weibchen Pikrinschwefelsäure allein (ist schlecht) oder mit 10 % Eisessig (nach Henneguy), ferner Pikrinsalpetersäure, Sublimat in Alkohol gelöst

(schrumpft sehr stark), Sublimat und Formol, findet aber am besten Flemmings starkes Gemisch, nur muss man in diesem Falle die Eier mit Kaliumchlorat und Salzsäure (oben § 568) bleichen. Aufbewahrung in 80 %igem Alkohol oder in einem Gemisch gleicher Theile von Alkohol, Wasser und Glycerin. Die Eier präparirt man unter dem Mikroskop frei und bringt sie in Glycerin unter ein Deckglas, das durch Stücke von Capillarröhren so gestützt ist, dass die Eier sich rollen lassen. Färbungen helfen nicht, da stets das Plasma mehr Farbe aufnimmt als die Kerne.

LENSSEN (La Cellule Tome 14 1898 p. 428) fixirt die Eier von *Hydatina* 20 Sekunden lang mit kalter Sublimatlösung.

629. Turbellarien. Nach GARDINER (Journ. Morph. Boston Vol. 11 1895 p. 158) eignen sich für die Eier von *Polychoerus* in jungen Stadien die gebräuchlichen Fixirmittel sämmtlich nicht, da sie die Furchen zerstören; relativ das beste ist noch ein Gemisch von absolutem Alkohol und Eisessig zu gleichen Theilen.

IJIMA (Zeit. Wiss. Z. 40. Bd. 1884 p. 361) öffnet die Eikapseln von Süsswasserplanarien auf dem Objektträger mit einer Nadel in einem Tropfen 2 %iger Salpetersäure, lässt die Eier heraustreten und legt ein Deckglas auf, das aber durch Wachsfüsschen oder Papier gestützt ist. Nach $^1/_2$ Stunde lässt er unter das Deckglas erst Alkohol von 70, dann von 90 %, darauf verdünntes und zuletzt reines Glycerin treten. Zum Schneiden härtet er die ganze Kapsel in 1 %iger Chromsäure.

FRANCOTTE (Arch. Z. Expér. (2) Tome 6 1898 p. 196) fixirt die Eier der Polycladen für Oberflächenbilder in Hermanns oder Fols Gemisch, wäscht sie in einem Gemisch von Glycerin, Alkohol und Wasser aus (s. hierüber und über die Färbung oben p. 190). Fixation für Schnitte ähnlich oder in Sublimatlösung mit 5 % Essigsäure. Als Intermedium beim Einbetten in Paraffin dient Cedernöl oder Chloroform; auch kann man die Eihaufen vorher mit Kollodium durchtränken. — Nach VAN DER STRICHT (Arch. Biol. Tome 15 1898 p. 370) schneiden sich die Eier von *Thysanozoon* nur dann gut, wenn sie nicht länger als 2 Minuten in absol. Alkohol bleiben; Einbettung aus Chloroform in Paraffin ähnlich wie nach Carnoy & Lebrun (oben p. 304).

630. Cestoden. VAN BENEDEN (Arch. Biol. Tome 2 1881 p. 187) behandelt die Eier von *Taenia* zuerst mit 1 %iger Osmiumsäure, dann 1 Stunde lang mit 30 %igem Alkohol, wäscht sie mit Wasser, färbt sie 2—3 Tage lang mit Pikrokarmin und hebt sie in Glycerin mit etwas Pikrokarmin auf. Bei älteren Embryonen muss man aber zuvor

die Chitinhülle sprengen, indem man unter dem Deckglase mit Filtrirpapier so viel Flüssigkeit wegsaugt, dass der Druck des Deckglases dazu stark genug wird.

631. Trematoden. Coe (Z. Jahrb. Abth. Morph. 9. Bd. 1896 p. 563 u. 566) fixirt die Miracidien von *Distomum* mit den gebräuchlichen Mitteln; speziell zur Darstellung des Exkretionssystems tödtet er sie mit Osmiumsäure, spült sie mit destillirtem Wasser ab und lässt sie 2 Tage oder länger in $^1/_4$ %iger Lösung von Höllenstein.

632. Nematoden. Boveri (Jena. Zeit. Naturw. 21. Bd. 1887 p. 423) fixirt die Eier von *Ascaris* in seiner Pikrinessigsäure (oben § 97), bringt sie dann direkt in Alkohol von 70 %, färbt sie mit Boraxkarmin und überträgt sie in ein Gemisch von 1 Theil Glycerin und 3 Theilen absol. Alkohol, von dem er alsdann den Alkohol langsam abdunsten lässt. — Zur Strassen (Arch. Entwickelungsmech. 3. Bd. 1896 p. 29) fixirt sie 24 Stunden lang in einem Gemisch von 4 Theilen Alkohol von 96 % und 1 Theil Essigsäure, bringt sie dann in reinen Alkohol, färbt sie mit Salzsäurekarmin (oben § 234) und führt sie allmählich in Glycerin über.

Zoja (Arch. Mikr. Anat. 47. Bd. 1896 p. 218) fixirt die Eier wie Herla im Gemisch von absol. Alkohol (5 Vol.) und Eisessig (1 Vol.) 24 Stunden lang, bringt sie von da in eine konzentr. wässerige Lösung von Bismarckbraun und untersucht sie in Drittelglycerin. Zum Schneiden setzt er dem obigen Fixirgemisch etwas Platinchlorid (auf 2—3 ccm 1 Tropfen einer 10%igen Lösung) zu und bringt die Eier 1—2 Tage später in absol. Alkohol, von da vorsichtig durch Chloroform in Paraffin. Färbung der Schnitte meist mit Bordeaux R und Eisenhämatoxylin. — Erlanger (ibid. 49. Bd. 1897 p. 309) öffnet die Würmer in Normalsalzwasser von 37° C., fixirt die Eier in Alkohol mit Eisessig (1 Vol. auf 4 Vol. 95%igen) und bringt sie ebenfalls durch Chloroform in Paraffin (von 54° C.). Zum Färben der ganzen Eier dient ein „Gemisch von gleichen Theilen Jodgrün und Bismarckbraun und ein anderes von 2 Theilen Jodgrün auf 1 Theil Säurefuchsin in 10% Glycerin gelöst“. — S. auch oben § 282 (Herla).

Kostanecki & Siedlecki (Arch. Mikr. Anat. 48. Bd. 1896 p. 184) fixiren die Eileiter 24 Stunden lang entweder in konzentr. Sublimatlösung (in Normalsalzwasser) oder in 3 %iger Salpetersäure oder in Gemischen dieser beiden Flüssigkeiten (s. oben p. 48) etc., bringen sie gradatim in absol. Alkohol und betten sie äusserst vorsichtig aus Chloroform in Paraffin (von 52°) ein. Die Eier dürfen aber höchstens 8 Stunden einer Temperatur über 35° ausgesetzt sein, sonst schrumpfen sie zu stark. Oder aus dem absol. Alkohol kommen die Eier all-

mählich in 30 %igen zurück, werden gefärbt und in dünnes Glycerin gebracht, das durch Verdunsten konzentrirt wird.

CARNOY & LEBRUN (La Cellule Tome 13 1897 p. 64) wenden zum Fixiren ein Gemisch von Gilson (s. oben § 83) an: den an manchen Stellen angeschnittenen Ovidukt lassen sie so lange darin, bis er (nach etwa 10 Minuten) zu Boden sinkt, waschen ihn mit schwachem Alkohol gut aus und bringen ihn allmählich in 80 %igen. Beim Einbetten dürfen die Eier höchstens 1½ Minute lang im warmen Paraffin verweilen (s. im Uebrigen § 590 die Angaben über das Einbetten der Eier der Batrachier). Celloidin dringt zwar auch in schwachen Lösungen frühestens in 14 Tagen durch die Eischale, mithin dauert die Einbettung wenigstens 2 Monate; aber die Eier sind dann viel weniger geschrumpft als in Paraffin. Zum Färben dient am besten Hämatoxylineisen nach Heidenhain (allein oder mit Congo- oder Bordeauxroth); das Kollodium wird zuletzt durch absoluten Alkohol erweicht und durch Cajeputöl aufgelöst; Einschluss in Kolophonium.

CARNOY (La Cellule Tome 3 1887 p. 6) verwandte zuerst ein Gemisch von 3 Theilen absolutem Alkohol mit 1 Theil Eisessig; später (ibid. p. 276) das Gemisch mit Chloroform (oben § 82); 5—15 Minuten genügen auch für die resistentesten Eier. — VAN BENEDEN & NEYT (Bull. Acad. Belg. (3) Tome 14 1887 p. 214) nehmen Alkohol und Eisessig zu gleichen Theilen oder sogar reine Essigsäure.

BOVERI (Festschr. Kupffer Jena 1899 p. 386) braucht auch jetzt noch seine Pikrinessigsäure oder sauren 70 %igen Alkohol (mit 5 oder 10 % Essigsäure). — S. auch FÜRST (Arch. Mikr. Anat. 52. Bd. 1898 p. 106) und BOVERI (Zellen-Studien Heft 4 Jena 1900 p. 63).

633. Ueber die Echinodermen, Cölenteraten und Poriferen s. in Kapitel 31.

---

24. Kapitel.

Methoden zur Untersuchung der Zelle.

634. Studium der lebenden Zelle. Eins der besten Objekte hierfür ist der Schwanz junger Larven von anuren oder urodelen Amphibien (PEREMESCHKO in: Arch. Mikr. Anat. 16. Bd. 1879 p. 453ff.). Im lebenden Thiere sind die Epithelzellen und ihre Kerne in der Ruhe so durchsichtig, dass man sie nicht ohne Weiteres wahrnimmt, sondern nur, wenn man das Thier curarisirt oder noch besser es nach dem Curarisiren $^1/_2$ Stunde lang in 1 $^0/_0$iges Salzwasser legt. Zum Studium der Mitose kann man die Larven zwar ohne Weiteres verwenden, aber man spart viel Zeit, wenn man auch sie curarisirt.

Curare. Man löst 1 Theil davon in 100 Theilen Wasser und setzt ebenso viel Glycerin hinzu. Von diesem Gemisch gibt man in ein Uhrglas voll Wasser 5—10 Tropfen, für grössere Larven auch mehr, und lässt es $^1/_2$—1 Stunde einwirken. Die Larven dürfen aber nicht so lange darin bleiben, bis sie sich gar nicht mehr rühren, sondern sobald sie träge werden, nehme man sie heraus und lege sie auf einen Objektträger unter Filtrirpapier. Bringt man sie in Wasser zurück, so werden sie in 8—10 Stunden wieder ganz normal und können noch mehrmals curarisirt werden.

Aehnliche Wirkungen übt ein Zusatz von 3 $^0/_0$ Alkohol oder 3 $^0/_0$ Aether zum Wasser aus. Beide hindern die Zelltheilungen nicht, sind daher nützlich, betäuben aber nicht gleichmässig.

Indifferente Medien. Als solche dienen 1 $^0/_0$iges Salzwasser, Jodserum, Zuckersaft, kaltes Wasser (+ 1 ° C.) und warmes Wasser (35—40 ° C.) Man schneidet dem lebenden Thiere den Schwanz ab und kann ihn dann in einem solchen Medium lange Zeit studiren.

Ueber die Färbung lebender Zellen s. oben § 206.

635. Studium frischer oder leicht fixirter Zellen. FLEMMING hat mit Recht darauf hingewiesen, dass die sogenannten indifferenten

Medien durchaus nicht ganz ohne Wirkung auf die Kerne sind; man sollte sie daher eher schwache Fixirmittel nennen. Zwischen ihnen und den energischen Mitteln, z. B. dem Flemmingschen Gemisch, stehen die mittelstarken Fixirmittel, wie Pikrinsäure oder ganz schwache Essigsäure, und diese gerade eignen sich zum Studium frischer isolirter Zellen.

Ein typisches Beispiel für diese Art von Verfahren ist folgendes. Man zerzupft ein Stück lebendes Gewebe in einem Tropfen einer Lösung von Methylgrün, die mit $^3/_4$ % Essigsäure versetzt ist. Dieses Gemisch tödtet die Zellen augenblicklich ohne Aenderung der Form. Dann setzt man das Präparat noch $^1/_4$ Stunde Osmiumdämpfen aus, gibt einen Tropfen des Gemisches von Ripart & Petit hinzu und deckt ein Deckglas darüber. Oder man lässt die Osmiumdämpfe nur $^1/_2$ bis 2 Minuten auf das zerzupfte Gewebe wirken, setzt einen Tropfen von dem obigen Methylgrün zu, wäscht nach 5 Minuten mit 1 %iger Essigsäure aus, gibt das Gemisch von R. & P. darauf und deckt das Deckglas darüber. Oder endlich man zerzupft direkt im Gemisch von R. & P. (eventuell mit einer Spur Osmiumsäure dazu) und färbt mit Methylgrün.

Auch das Chlormangan nach Pictet (§ 386) habe ich (Lee) sehr nützlich gefunden; man mag ein wenig Dahlia hinzufügen. Das Gemisch von Henking (§ 422) mag ebenfalls gut sein.

Natürlich lassen sich auch andere Fixirmittel, z. B. Pikrinsäure oder schwache Lösung von Sublimat, mit Vortheil verwenden, manchmal ohne Zweifel mit noch grösserem als die obigen. Desgleichen werden unter Umständen andere Färbmittel, z. B. Bismarckbraun, und selbstverständlich auch andere Medien als das Gemisch von R. & P. nützlich sein. Im Allgemeinen jedoch gibt die obige Methode — Methylgrün, Osmiumsäure, Gemisch von R. & P. — so gute Resultate und ist zugleich so bequem, dass man sie wohl eine klassische Methode zum Studium der frischen Zellen nennen darf.

636. Einige mikrochemische Reaktionen (s. auch § 641). Methylgrün ist ein Reagens auf Chromatin, insofern als es in frischen Geweben (s. p. 189) im Kern nur das Chromatin färbt. Allerdings wechselt die Färbung an Stärke nach den Kernen sehr, kann in einigen sehr schwach werden oder anscheinend sogar ganz fehlen. Dann aber muss man andere Mittel anwenden, um die An- oder Abwesenheit

des Chromatins sicher festzustellen. Daher seien hier nach CARNOY (Biol. Cellulaire p. 208) noch einige weitere Reaktionen angegeben.

Das Chromatin ist weder in Wasser noch in verdünnten Mineralsäuren (z. B. $^1/_{10}$ % iger Salzsäure) löslich, dagegen leicht in konzentrirten, ferner in Alkalien, selbst in sehr verdünnten, und in einigen alkalischen Salzen, wie Kaliumkarbonat und Natriumphosphat. In 10 % iger Kochsalzlösung schwillt es zu einer Gallerte an oder löst sich oft gänzlich. In den gebräuchlichen Verdaumitteln ist es, solange es im Kern liegt, nur theilweise verdaulich.

Zum Lösen des Chromatins eignen sich in der Praxis am besten 1 % ige Kalilauge, rauchende Salzsäure, Cyankalium oder Kaliumkarbonat. Letztere beiden geben meist bessere Resultate als verdünnte Alkalien und lassen sich in 40—50 % iger Lösung verwenden. Will man aus einem Kern alles Chromatin weglösen, so muss man das Reagens oft 2—3 Tage wirken lassen, namentlich wenn man das Präparat auf einem Objektträger unter dem Deckglase, was das Sicherste ist, damit behandelt. Aber man muss dazu frische Zellen verwenden, denn in den gehärteten ist das Chromatin fast unlöslich in Ammoniak, Kalilauge, Natriumphosphat etc. Nur die Salzsäure bringt es dann zum Quellen und löst es, allerdings schwierig.

Auch die partielle Verdauung eignet sich mitunter zum Studium des Chromatins in den Kernen. Es widersteht nämlich der Verdauung viel länger als die Albumine, und so kann man die Chromosomen von allen etwaigen karyoplasmatischen Einlagerungen frei machen und zugleich das Cytoplasma aufhellen.

Ausdrücklich sei auf ZIMMERMANN, Morphologie und Physiologie des pflanzlichen Zellkernes, Jena 1896, hingewiesen, weil darin ausführlich das mikrochemische Verhalten auch des thierischen Zellkernes erörtert wird. Dies gilt ferner von mehreren Schriften des Botanikers ZACHARIAS, der unter Anderem (Ber. D. Bot. Ges. 16. Bd. 1898 p. 185) mit Recht betont, dass es kein allgemeines Reagens auf Zellkerne gibt, wohl aber Methoden zur Erkennung der Nucleïne in den Kernen. Aehnlich HEINE (Zeit. Phys. Chem. 21. Bd. 1896 p. 494).

SAINT-HILAIRE (ibid. 26. Bd. 1898 p. 102) bringt eine interessante, aber sehr komplizirte Methode zum Nachweis des Nucleohistons: er lässt die Kerne Kupfer aufnehmen und weist dieses durch Ferrocyankalium nach. — Ueber eine ähnliche Wirkung der Molybdänsäure s. oben § 380 (HEINE).

S. auch *HÄCKER, Praxis und Theorie der Zellen- und Befruchtungslehre Jena 1899. und CARNOY & LEBRUN (La Cellule Tome 12 1897 p. 194 ff.).

637. Fixirmittel für Zellen. Kein einziges Reagens fixirt alle Theile der Zelle gleich gut. Was zunächst den Kern betrifft, so müssen alle Fixirmittel sauer reagiren, denn sonst werden das Chromatin und die Nucleolen nicht gut erhalten. Zwar glaube ich (Lee) nicht, dass z. B. Kaliumbichromat allein die Chromosomen so schlecht fixirt, wie gewöhnlich angenommen wird. Denn im Leben sind diese stets weniger unterscheidbar, gewissermassen mehr geschwollen, als wenn man sie durch Säuren fixirt hat. Indessen sie werden gerade durch letztere deutlicher, nur soll damit nicht gesagt sein, dass sie auch wirklich gut fixirt wären. Die gebräuchlichsten Gemische nun, die von Flemming und das von Hermann, sind ohne Zweifel meist gut (das Hermannsche bringt die Chromosomen mehr zum Schrumpfen als die anderen und gibt daher oft klarere Bilder), aber auch andere Mittel liefern ebenso brauchbare Resultate, z. B. das von Johnson (§ 57) und wohl auch das von Tellyesniczky (§ 55). Saure Sublimatlösungen geben ebenfalls leidliche Bilder der Kerne, wenigstens was das Chromatin betrifft; wo es sich in erster Linie um das Eindringen in schwer permeable Objekte (z. B. die Eier von *Ascaris*) handelt, mag man das Gemisch von Gilson (oben § 83) anwenden.

Die beiden Bestandtheile des Zellplasmas, das sogen. Spongioplasma und das sogen. Hyaloplasma, gleichzeitig zu fixiren, ist wohl möglich (z. B. mit Flemmings Gemisch), nicht aber immer rathsam. Wird nämlich das Hyaloplasma sammt seinen Körnern und sonstigen Einschlüssen total fixirt, so können letztere, indem sie sich auf dem Spongioplasma niederschlagen, sein Studium erschweren. Daher ist es manchmal besser, das Hyaloplasma nicht gleichzeitig zu fixiren. Mit dem Spongioplasma geht es dann verhältnissmässig leicht; hierfür sind verwendbar die sauren Gemische mit Osmiumsäure, Chromsäure, Pikrinsäure oder Sublimat, wohl am besten aber die von Flemming und Hermann (diese jedoch nur, wenn man dafür sorgt, dass das Hyaloplasma sich nicht durch langes Fixiren zu stark coagulirt). Ferner sind gut die beiden Gemische von vom Rath (§ 98); auch möchte ich das Gemisch von Bouin (§ 97), das zart und treu konservirt und nachherig allerlei Färbungen ebenso gut wie Sublimat zulässt, sehr empfehlen.

Das Hyaloplasma fixiren vielleicht nur zwei Reagentien total: Kaliumbichromat und Osmiumsäure. Letztere wirkt nach dieser Richtung hin in den Gemischen von Flemming und Hermann, fixirt

es allerdings nur in den äusseren Zellschichten gut, und gerade in diesen können leicht viele Zellen durch Ueberfixation ruinirt werden (s. oben § 39). Dem lässt sich einigermassen dadurch abhelfen, dass man die Menge der Osmiumsäure im Gemisch von Hermann stark (bis auf $^1/_8$) herabsetzt, jedoch darf man sie nicht etwa ganz weglassen wollen. Andererseits dringen diese Gemische nicht in die Tiefe, und gegen diesen bedauerlichen Mangel hilft auch der Ersatz der Chromsäure oder des Platinchlorids durch gut penetrirende Mittel, z. B. Pikrinsäure, nicht im Geringsten. Daher ist es zur Fixation des Hyaloplasmas oder seiner Einschlüsse oft rathsam, statt der Osmiumgemische das Kaliumbichromat zu wählen; in erster Linie das Gemisch von Johnson (§ 57), das freilich die äusseren Schichten überfixiren mag, oder das von Tellyesniczky (§ 55). Auch Sublimat (sauer) fixirt leidlich und gewährt vor Flemmings Gemischen den Vortheil, dass die Gewebe hinterher manche Farbstoffe besser annehmen. Aber ich glaube, dass es leicht wichtige Artefakte hervorbringen kann.

638. Färbmittel für das Chromatin. Für frische oder schwach fixirte Gewebe s. § 635. — Für Schnitte durch gehärtete Objekte verwende man solche, die zugleich sehr intensiv und sehr scharf färben. Früher brauchte man besonders Safranin und Gentianaviolett, gegenwärtig nimmt man eher Eisenhämatoxylin. Ich (Lee) möchte hier auch unter Umständen Kernschwarz empfehlen, und ich (Mayer) Thionin sowie Hämalaun.

Bataillon & Köhler (C. R. Acad. Sc. Paris Tome 117 1893 p. 521) betrachten das Methylenblau als ein „véritable réactif de la chromatine en mouvement“: sie fixiren das Blastoderm von Knochenfischen mit Flemmings Gemisch, färben es in einer mit Borax versetzten Lösung von Methylenblau, waschen es flüchtig ab, färben es mit einer wässerigen Lösung von Eosin nach und bringen es in Balsam.

639. Färbmittel für das Plasma. Ich (Lee) kenne kein einziges, das wirklich befriedigte. Alle mir geläufigen sind nur unvollkommen electiv; es ist nämlich schwer, wenn nicht unmöglich, ihre Wirkung ganz sicher und scharf auf die Elemente in der Zelle zu beschränken, die man färberisch hervorheben möchte.

Ueber das Kernschwarz s. § 346. — Das Orange G nach Flemming wird zwar viel gebraucht und gelobt, ist aber sehr launisch. — Ebenso Lichtgrün oder Säureviolett (oben § 327), die aller-

dings zuweilen prächtige Resultate geben. Ueber Säurefuchsin und Orange s. § 314 und 310, über das Gemisch von Ehrlich s. § 316 u. 317, über Wasserblau § 336. Osmiumsäure und Pyrogallol (§ 377) gibt schöne und oft nützliche Färbungen.

Das Hämatoxylineisen nach Benda oder Heidenhain gibt je nach dem Grade des Auswaschens gute Plasmafärbungen. Das Heidenhainsche soll spezifisch die Centrosomen färben, und das soll nach H. und anderen Forschern noch schärfer der Fall sein, wenn man vorher Bordeaux R anwendet. Letzteres, das zwar an das Chromatin und Plasma gehe, nicht aber an die Centrosomen, sättige die chemischen Affinitäten jener beiden Zelltheile dermassen, dass sie die Eisenverbindung nicht mehr so zäh festhalten wie sonst, sondern sie beim Auswaschen wieder abgeben, während die Centrosomen noch zum Festhalten des Eisens frei seien. (HEIDENHAINS Theorie der subtraktiven Färbung; übrigens von UNNA in: Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1896 p. 454 bereits als die der tinktoriellen Präoccupation bezeichnet.)

Vom Bordeaux R nimmt HEIDENHAIN (Arch. Mikr. Anat. 43. Bd. 1894 p. 665) eine „dünne" Lösung und tingirt damit die Schnitte von Material aus Sublimat 24 Stunden lang, bis sie so tief gefärbt sind, dass sie sich gerade noch für die mikroskopische Untersuchung mit starken Linsen eignen würden (l. c. p. 440 Anm.). Dann bringt er sie nach einander in den Eisenalaun und das Hämatoxylin und entfärbt sie zuletzt im Eisenalaun so lange, bis das Chromatin wieder fast oder ganz farblos geworden ist. Statt des Bordeaux R, das also nicht zum Färben des Plasmas dienen, sondern wie oben angegeben wirken soll, kann man auch Anilinblau nehmen.

Neuerdings gibt HEIDENHAIN noch genauere Vorschriften für das Färben seiner Centralkörper (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 186). S. ferner HEIDENHAIN in: Morph. Arb. Schwalbe 7. Bd. 1897 p. 243, sowie oben § 261, aber auch die nicht unberechtigte Kritik von FISCHER (Fixirung etc. p. 229), FÜRST (Arch. Mikr. Anat. 52. Bd. 1898 p. 108), VOM RATH (Z. Anzeiger 21. Bd. 1898 p. 413) und BOVERI (Zellenstudien 4. Heft Jena 1900 p. 12, 89 etc.).

Ueber Apáthys Methoden zur Vergoldung s. § 364.

HERMANN (Arch. Mikr. Anat. 37. Bd. 1891 p. 583) empfiehlt eine Modifikation der Palschen Färbung mit Hämatoxylin. — S. auch HERMANN über die Methoden zum Studium des Archoplasmas etc. (Anat. Hefte 2. Abth. 2. Bd. 1893 p. 23). — Ueber das Hämatoxylin-Vanadium von Heidenhain s. COHN (Anat. Hefte 1. Abth. 5. Bd. 1895 p. 302) und HEIDENHAIN (Arch. Mikr. Anat. 54. Bd. 1899 p. 186).

640. Dotterkern. Er ist ohne Reagentien in den Eiern mancher Thiere, speziell der Arachniden zu sehen. Nach BALBIANI (Z. Anzeiger 6. Jahrg. 1883 p. 659) wird er deutlicher durch Behandlung mit einem Gemisch von Essigsäure und 1%iger Osmiumsäure zu gleichen Theilen. — S. auch HENNEGUY

(Journ. Anat. Phys. Paris 29. Année 1893 p. 1), wo die ältere Literatur genau angegeben wird, und BALBIANI (ibid. p. 145).

641. Zellgranula. Die meisten sind ohne Zweifel Produkte des Stoffwechsels. Am besten studirt man sie in Drüsenzellen oder Blut- und Lymphzellen, sowie in einigen Arten Bindegewebzellen. Allermeist färbt man sie mit den Gemischen von Ehrlich. Genaueres s. unten § 773 ff. Ueber die intravitale Färbung s. oben § 206.

BENDA (Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. 1900 p. 169) fixirt zur Darstellung der Sekretgranula die Gewebe 24 Stunden lang in 10%igem Formalin und bringt dann kleine (höchstens 1/2 cm dicke) Stücke direkt in Lösungen von Chromsäure (erst eine 1/4-, dann 1/3-, dann 1/2%ige) und nach dem Auswässern behutsam in Paraffin.

Ueber Arnolds Plasmosomen s. oben § 50 u. 510.

Ueber Altmanns Bioblasten s. ALTMANN, Studien über die Zelle (1. Heft Leipzig 1886) und: Die Elementarorganismen (Leipzig 1890, 2. Aufl. 1893), ferner Altmann in: Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1892 p. 223 sowie R. & L. ZOJA in: Mem. Ist. Lombardo Sc. Vol. 16 1891 p. 237. Erhalten werden sie durch Fixiren in einem Gemisch gleicher Theile einer 5%igen Lösung von Kaliumbichromat und einer 2%igen Osmiumsäure (24 Stunden lang), Einbetten in Paraffin, Färben der Schnitte auf dem Objektträger mit einer heissen Lösung von 20 g Säurefuchsin in 100 ccm Anilinwasser (oben p. 193), Auswaschen mit einer heissen Lösung von Pikrinsäure (die konzentrirte in absol. Alkohol mit dem Doppelten an Wasser verdünnt) und Ueberführen durch Xylol in Balsam. — WEISS & ROSENSTADT (Centralbl. Med. Wiss. 30. Jahrg. 1892 p. 963) nehmen zum Entfärben (und gleichzeitigen Färben der Kerne) eine 2%ige Lösung von Methylenblau in 10%iger Salpetersäure. — S. auch ALTMANN (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1892 p. 224; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 331): eine 2 1/2%ige Lösung von Ammoniummolybdänat mit 1/4% Chromsäure zur Darstellung der Granula im Zellkern.

FISCHER (Fixirung etc. p. 108 u. 130) legt dar, dass Altmanns Färbmethode kein spezifisches Reagens auf Zellgranula ist. — S. auch oben § 56, sowie EHRLICH & LAZARUS (Anämie 1. Abth. Wien 1898 p. 81 ff.).

Das Glykogen weist CREIGHTON (Formative Property of Glycogen. Part 1 London 1896 p. 11) in den Geweben der Säugethiere auf Schnitten, die mit dem Rasirmesser gemacht sind, theils in bekannter Weise durch eine wässerige Lösung von Jodjodkalium, theils durch eine solche von Methylviolett (färbt rubinroth, anders als bei Amyloid) nach; die Präparate werden in Gummiglycerin aufbewahrt. — EHRLICH & LAZARUS (Anämie 1. Abth. Wien 1898 p. 30) weisen es im Blute nach, indem sie das Präparat in ein geschlossenes Gefäss neben Jodkristalle legen und es später in eine gesättigte Lösung von Lävulose einschliessen.

Eisenhaltige Körnchen im Deutoplasma der Eier von *Ostrea* weist CARAZZI (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 14. Bd. 1897 p. 134) auf die gewöhnliche Art mit gelbem Blutlaugensalz und Salzsäure (s. § 642) nach, und zwar entweder direkt oder nach vorheriger Behandlung der aufgeklebten und vom Paraffin befreiten Schnitte mit den Dämpfen von Osmiumsäure; diese oxydire die organische Substanz und mache so das Eisen zugänglich. — Ebenfalls mit Blutlaugensalz ermitteln BOYCE & HERDMAN (Proc. R. Soc. London Vol. 62 1897 p. 35) die Gegenwart von Kupfer im Blute grüner Austern und bedienen sich dazu ferner (ibid. p. 36) nach dem Vorgange von MACALLUM (Journ. Phys. Cambridge Vol. 22 1897 p. 92: Unterscheidung von anorganischem und organischem Eisen in den Geweben) des Hämatoxylins in wässeriger Lösung, das die kupferhaltigen, allerdings auch die eisenhaltigen Zellen blau färbt. S. hierzu aber MARFORI (Arch. Ital. Biol. Tome 30 1898 p. 186). — Ueber Eisen in den Geweben s. ferner MACALLUM (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 38 1895 p. 175), SCHNEIDER (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1895 p. 208; ältere Literatur dort angegeben) und CARNOY & LEBRUN (§ 642).

Nach MACALLUM (Proc. R. Soc. London Vol. 63 1998 p. 467) ist der Phosphor nachweisbar durch Ammoniummolybdänat, wenn man hinterher mit Phenylhydrazinchlorhydrat in 1—4 %iger wässeriger Lösung reduzirt. — S. jedoch HEINE (Zeit. Phys. Chemie 22. Bd. 1896 p. 132).

GRANDIS & MAININI (Arch. Ital. Biol. Tome 34 1900 p. 75) weisen unlösliche Kalksalze in den Geweben durch Färben der Schnitte mit einer konzentr. alkoholischen Lösung von Purpurin, Uebertragen (5—10 Minuten später) in Normalsalzwasser auf einige Minuten, gründliches Auswaschen mit Alkohol und Einlegen in Balsam nach. Auch Pyrogallussäure kann verwandt werden, gibt aber keine so scharfen Kontraste.

642. Nucleolen. Sie sind häufig schon ungefärbt durch ihre stärkere Lichtbrechung erkennbar. In frischen Geweben färben sie sich mit Methylgrün und Essigsäure nicht, und in fixirten nehmen sie aus Ehrlichs Triacid und ähnlichen Gemischen meist den sauren (oder die sauren) Farbstoff auf. Dagegen färben sie sich bei regressiver Tinktion mit Safranin etc. wenigstens ebenso stark wie das Chromatin der Mitosen. Mit Eisenhämatoxylin werden sie oft ganz schwarz, oft

nur aussen, dagegen innen grau. — S. auch REDDINGIUS (Arch. Path. Anat. 162. Bd. 1900 p. 207).

LIST (Mitth. Z. Neapel 12. Bd. 1896 p. 480) differenzirt in den Eiern von *Mytilus*, *Pholas*, *Pristiurus* und *Sphaerechinus* die Kernkörper durch Färbung mit Berlinerblau.

Auf einen Schnitt von Material aus Sublimat lässt er 2 Tropfen einer 1 1/2 %igen Lösung von gelbem Blutlaugensalz etwa 5 Minuten lang einwirken, giesst den einen überflüssigen Tropfen ab und setzt 1—2 Tropfen einer 1%igen Salzsäure zu: das sich bildende Berlinerblau färbt den Nebennucleolus, während bei Nachfärbung mit Karmin der Hauptnucleolus roth wird. Unter Umständen ist es nöthig, den Präparaten zuerst Eisen einzuverleiben, indem die Objektträger auf 1/2 Stunde in ein Bad von Eisenchlorid (10 Tropfen einer Lösung von 1/2 g des an der Luft zerflossenen Salzes auf 100 Wasser werden vermischt mit 5 oder 15 Tropfen 1%iger Salzsäure und 50 g Wasser) kommen.

Auch in anderen Geweben lässt sich auf diese Weise der Nucleolus färben, nur muss das Bad von Eisenchlorid stärker sein. Ferner wird der Schleim in den Schleimzellen tief blau. (Auch Eisenacetat und -tartrat sind verwendbar.) — Ueber Eisen in den Nucleoli s. CARNOY & LEBRUN (La Cellule Tome 12 1897 p. 275).

Ueber die Kernkörper der Nervenzellen s. RUŽIČKA (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1898 p. 453) und LEVI (Riv. Pat. Nerv. Ment. Firenze Vol. 3 1898 p. 289).

Ueber eine Doppelfärbung mit Jodgrün und Fuchsin nach ZIMMERMANN s. Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1896 p. 463 (Chromosomen fast stets grün, Nucleolen roth) sowie FISCHER (Fixirung etc. p. 140), über dieselbe mit Methylgrün und Safranin nach MAYER die 1. Aufl. dieses Buches p. 638.

---

25. Kapitel.

Methoden zur Untersuchung der Haut.

643. Epithel. Eine der besten Methoden, um instruktive Ansichten der Oberfläche von Epithelien zu erhalten, ist die mit Höllenstein. Hierüber s. oben § 355ff. Ferner kann die Methode von Hoggan mit Eisen und Pyrogallussäure (oben § 379), sowie die mit Osmiumsäure und Pyrogallussäure (oben § 377) hier gute Dienste leisten, ebenso Methylenblau.

Schnitte erhält man nach den gewöhnlichen Methoden, jedoch leistet dickes Epithel dem Messer starken Widerstand, und man kann daher stark verhornte Haut in Paraffin mitunter nur schwierig schneiden.

Macerirmittel. Für weiche Epithelien nimmt man Jodserum, Drittelalkohol, Speichel oder Normalsalzwasser von 0,75 % (Bizzozero in: Internation. Monatsschr. Anat. Hist. 2. Bd. 1885 p. 278) etc.; für harte Epithelien so energische Mittel wie die 40 %ige Kalilauge. — Minot (Amer. Natur. Vol. 20 1886 p. 575) macerirt mehrere Tage in Normalsalzwasser (0,6 %) mit 0,1 % Thymol, um die Epidermis von Embryonen zu isoliren und die Entwickelung der Haare zu verfolgen. — Mitrophanow (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 513) legt einen Embryo von *Siredon* auf $^1/_4$ Stunde in 3 %ige Salpetersäure, dann in Drittelalkohol; bereits nach 1 Stunde löst sich die Epidermis in Fetzen ab, und ist der Embryo 24 Stunden lang in stärkerem Alkohol gewesen, so geht sie fast ganz herunter. — Löwy (Arch. Mikr. Anat. 37. Bd. 1891 p. 159) empfiehlt zur Ablösung der Epidermis vom Corium ein 24—48stündiges Maceriren in 6 %igem Holzessig bei etwa 40° C. Auch $^1/_3$ %ige Essigsäure ist gut (Philippson in: Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 222). — S. auch § 644.

Mayer (Lotos Prag (2) 12. Bd. 1892) empfiehlt zur Untersuchung der Epidermis von *Rana, Bufo* und *Mus*. Stücke der Hornhaut oder Nickhaut $^1/_2$—1 Minute lang den Dämpfen von Essigsäure auszusetzen und dann in Salzwasser ($^1/_2$ %) zu bringen; bei gewöhnlicher Haut

von *Rana* lässt sich dann die Epidermis vom Corium durch Streichen mit einer Nadel leicht trennen.

Flimmerepithel. Nach EWALD (Zeit Biol. 34. Bd. 1897 p. 262) macerirt Flimmerepithel sich besser in Müllers Gemisch (24 Stunden lang) als in Drittelalkohol. Auswaschen mit Wasser, Färben mit Hämatoxylin in wässeriger Lösung (etwa $^1/_8$ %), Aufbewahren in 50 %igem Alkohol, Einschliessen in Glyceringelatine. S. ferner unten § 828.

644. Epidermis von Fischen. REID (Phil. Trans. Vol. 185 B. 1894 p. 345) macerirt die Haut von *Anguilla* 24—48 Stunden lang in Ranviers Drittelalkohol oder einige Tage lang in $^1/_{10}$ %iger Osmiumsäure. Zu Schnitten ist am besten die Fixirung in Flemmings Gemisch oder in 10 %iger Salpetersäure (24 Stunden lang) und nachher in 1 %iger Osmiumsäure (eben so lange). Färbung in toto oder der Paraffinschnitte mit den gebräuchlichen Mitteln.

MAYER (Mitth. Z. Stat. Neapel 8. Bd. 1888 p. 352) macerirt die Haut von Selachiern (besonders *Raja*) einige Stunden lang in einem Gemisch von 80 Maasstheilen Essigsäure (von 50 %), 150 Theilen 1 %iger Chromsäure und 750 Theilen Wasser.

KAPELKIN (Bull. Soc. Natural. Moscou (2) Tome 10 1897 p. 498) fixirt die Haut von *Petromyzon* in Sublimat oder Sublimatplatinchlorid oder 70 %igem Alkohol mit Jod, macerirt sie in Drittelalkohol oder Müllers Gemisch und imprägnirt sie mit Silber (frisch mit $^1/_2$ %iger Lösung von Höllenstein; oder nach Golgi) oder mit Gold (nach Ranvier). Färbung in toto oder der Schnitte wie gebräuchlich.

645. Stachelzellen und Intercellularkanäle. Ausser der Maceration, die eine der besten Methoden hierfür ist, leistet die Imprägnation gute Dienste. MITROPHANOW (Zeit. Wiss. Z. 41. Bd. 1884 p. 302; Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1884 p. 191) wäscht den Schwanz einer Larve von *Siredon* mit destillirtem Wasser ab, legt ihn auf 1 Stunde in $^1/_4$ %iges Goldchlorid (mit 1 Tropfen Salzsäure auf ein Uhrglas voll), wäscht ihn wieder und reduzirt das Gold in einem Gemisch von 1 Theil Ameisensäure und 6 Theilen Wasser. — S. hierüber ferner IDE (La Cellule Tome 4 1888 p. 409: keine neuen Methoden) und KOLOSSOW (Arch. Mikr. Anat. 52. Bd. 1898 p. 2: Injiziren eines sauren Gemisches von Osmiumsäure und Salpeter, damit die Zellen schrumpfen).

646. Keratohyalin. UNNA (Monatsh. Prakt. Dermat. 20. Bd. 1885 p. 69; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1897 p. 337) gibt eine

Menge Methoden zur Färbung des Keratohyalins in Schnitten durch die Hohlhand, Fusssohle etc. des Menschen an. Man überfärbt mit Hämateïnthonerde, legt dann die Schnitte auf 10 Sekunden in eine Lösung von Kaliumhypermanganat 1 : 2000, dann in Alkohol; oder nach der Färbung auf 10 Minuten in eine 33 %ige Lösung von Eisenvitriol u. s. w. (Die Kerne färbt man hinterher mit Safranin.) Oder man färbt mit Pikrokarmin oder mit Mayers alkoholischem Karmin. Ferner lassen sich auch Säurefuchsin, Wasserblau, Fuchsin, Safranin, polychromes Methylenblau und Gentianaviolett verwenden, dabei werden aber meist komplizirte Beizen oder Entfärbmittel nöthig.

Ueber die Methoden zum Studium der Haut von *Homo* s. *Ledermann & Ratkowski (Mikr. Techn. im Dienste der Dermat. Wien u. Leipzig 1894) und *Joseph & Löwenbach (Dermato-hist. Technik Berlin 1899).

647. Plasmafasern im Epithel. Kromayer (Arch. Mikr. Anat. 39. Bd. 1892 p. 141; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 355) färbt die Schnitte durch menschliche Haut 5 Minuten lang in einem Gemisch von Anilinwasser (oben p. 193) und konzentrirter wässeriger Lösung von Methylviolett 6 B zu gleichen Theilen. Dann wäscht er sie gut und behandelt sie mit einer Lösung von Jodjodkalium, bis sie blauschwarz werden (in 1—30 Sekunden), wäscht sie wieder, trocknet sie mit Filtrirpapier ab, behandelt sie mit einem Gemisch von 1 Vol. Anilin und 2 Vol. Xylol bis zur guten Differenzirung und bringt sie endlich in reines Xylol. (Sehr dünne Schnitte erfordern mehr Xylol im Verhältniss zum Anilin, nämlich 1 : 3 oder 1 : 4, dickere mehr Anilin, nämlich 3 : 5 oder 3 : 3.) Gentiana- und Kristallviolett färben auch, aber nicht ganz so gut. S. auch Ehrmann (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 356).

Unna (Monatsh. Prakt. Dermat. 19. Bd. 1894 p. 1 u. 277; Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 61 u. 63) gibt eine ganze Reihe minutiöser Vorschriften, von denen einige hier kurz erwähnt werden mögen. 1. Wasserblau und Orceïn. Man färbt die Schnitte 10 Minuten lang in einer 1 %igen Lösung von Wasserblau, wäscht sie mit Wasser und bringt sie auf 5—10 Minuten in eine neutrale alkoholische 1 %ige Lösung von Grüblers Orceïn, um sie dann zu entwässern und in Balsam einzuschliessen. Varianten dieser Methode sind: a) 1 Minute oder 10 Minuten in W., 30 und mehr in O.; b) statt des O. eine saure Lösung von O. — 2. Man färbt wenigstens ½ Stunde lang in

Hämalaun, wäscht $^1/_2$ Minute in konzentrirter wässeriger Lösung von Pikrinsäure, dann eben so lange in Alkohol mit $^1/_2$ % Pikrinsäure. 3. Hämalaun 2 Stunden, neutrales Orceïn (wie oben) 10—20 Minuten.

Herxheimer (Arch. Mikr. Anat. 53. Bd. 1899 p. 519; 54. Bd. 1899 p. 289) färbt die Schnitte 10 Minuten lang in einer gesättigten Lösung von Kresylechtviolett, wäscht sie erst in Aether acetico-aceticus (Acetessigester) und bringt sie dann durch Alkohol in Nelkenöl. — Weidenreich (ibid. 56. Bd. 1900 p. 171) ist mit dieser Methode nicht zufrieden.

648. Horn, Haare, Nägel. Die Elemente von Haaren und Nägeln isolirt man durch Maceriren in Natron- oder Kalilauge, Ammoniak, kohlensauren Alkalien oder Schwefelsäure (kalt oder warm). — S. auch Nathusius (Z. Anzeiger 15. Jahrg. 1892 p. 395) und § 886 (Freud).

Günther (Haarknopf und innere Wurzelscheide. Dissert. Berlin 1895 p. 8) färbt die Paraffinschnitte von Haaren mit Böhmerschem Hämatoxylin, entfärbt sie mit Salzsäure-Alkohol, bläut sie in Wasser mit etwas Ammoniak, färbt sie mit Methyleosin und Pikrinsäure in wässeriger Lösung und bringt sie in Balsam. Ferner macerirt er theils frische, theils in Müllers Gemisch fixirte Haare bei 40 ° C. 2 Stunden bis 3 Tage lang in „Pepsin-Salzsäure-Glycerin“.

Horn färbt sich gut mit Safranin oder Gentianaviolett (Reinke in: Arch. Mikr. Anat. 30. Bd. 1887 p. 183). — Ernst (ibid. 47. Bd. 1896 p. 669) untersucht die Verhornung in der Haut und in anderen Organen nach der Methode von Gram (oben p. 195); s. jedoch die Kritik von Rabl (ibid. 48. Bd. 1896 p. 489).

649. Hautnerven. Ranvier (Traité 1. Ed. p. 900) empfiehlt für sie seine Methode mit Ameisensäure und Goldchlorid (oben § 369). Die Hautstücke werden nach der Reduktion in Alkohol gelegt, der sie weiter härtet und die Reduktion zum Stillstand bringt, und dann geschnitten. Aehnlich für Tasthaare (p. 914). Für die Tastmenisken in der Schnauze von *Sus* und *Talpa* braucht er (p. 910) ausserdem sein Goldchlorid mit Citronensaft (oben § 370).

Wolters (* Arch. Dermat. Syph. f. 1892; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 360) verwendet Hämatoxylin und Vanadium (s. unten § 716).

650. Tastkörperchen. Fischer (Arch. Mikr. Anat. 12. Bd. 1875 p. 366) vergoldet sie nach Löwit (oben § 368). Ranvier (Traité 1. Ed. p. 918) empfiehlt diese Methode, aber auch seine beiden eigenen (oben § 369 u. § 370). Die Haut wird erst vergoldet, dann in Alkohol gehärtet und geschnitten. Gleich anderen Forschern findet Ranvier Osmiumsäure und Pikrokarmin vortrefflich zum Studium der Tastkörperchen und der Pacinischen Körperchen. Auch Purpurin oder

Hämateïnthonerde eignen sich zum Nachfärben. — Man sehe ferner LANGERHANS (Arch. Mikr. Anat. 9. Bd. 1873 p. 730), KULTSCHITZKY (ibid. 23. Bd. 1884 p. 362) und SMIRNOW (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 10. Bd. 1893 p. 244; Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 254), der neben der Vergoldung nach Löwit die rasche Methode von Golgi empfiehlt.

651. Herbstsche und **Grandrysche Körperchen.** DOGIEL (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1891 p. 184) injizirt eine 4%ige Lösung von Methylenblau blutwarm (40° C.) in die Adern am Kopfe von *Anser* oder *Anas*, nimmt Stücke von der Schnabelhaut, schneidet sie in Hollundermark, befeuchtet die Schnitte auf dem Objektträger mit Humor aqueus oder vitreus vom Thiere selbst (der mit etwas $^1/_{15}$%iger Methylenblaulösung vermischt ist) und legt sie einige Minuten an die Luft. Nach etwa 10—30 Minuten sind die Nervenenden gefärbt, und dann kommen die Schnitte in Ammoniumpikrat etc. (s. oben § 305). — GEBERG (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 10. Bd. 1893 p. 230; Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 244) verwendet ebenfalls diese Methode, ferner aber Osmiumsäure und die Goldmethode von Arnstein. Nach dieser legt man die Haut auf 24 Stunden in Kalkwasser, zieht nun die Hornschicht leicht ab, schneidet die Haut in Stücke und bringt diese auf 5 Minuten in $^1/_4$%ige Lösung von Goldchlorid, dann auf 24 Stunden in destill. Wasser; das inzwischen entstandene körnige Präzipitat wird durch Einlegen der Stücke in $^1/_4$%ige Lösung von Cyankalium und kräftiges Bepinseln entfernt. Zuletzt Einlegen in Dammar. Geberg verwendet das Goldchlorid doppelt so stark und $^1/_2$ Stunde lang.

CARRIÈRE (Arch. Mikr. Anat. 22. Bd. 1882 p. 146) legt die Wachshaut auf 20 Minuten in 50%ige Ameisensäure, dann auf ebenso lang in 1%ige Lösung von Goldchlorid und reduzirt sie in Pritchards Gemisch (Amylalkohol und Ameisensäure je 1 Theil, Wasser 98 Theile) im Dunkeln. (Die Methode rührt von Böhm her.)

652. Meissnersche und **Krausesche Körperchen** in der Cornea und Conjunctiva. DOGIEL (Arch. Mikr. Anat. 37. Bd. 1891 p. 602; 44. Bd. 1894 p. 15) schneidet das in toto herausgenommene Auge eines Menschen parallel zum Aequator 5—8 mm hinter dem Rande der Cornea auf, nimmt Linse etc. heraus, belässt aber die Conjunctiva im Zusammenhang mit der Cornea, schneidet sie in Stücke, färbt diese 1—1$^1/_2$ Stunde lang in Methylenblau plus Humor aqueus und behandelt sie weiter nach der gewöhnlichen Methode (oben § 305). — Man vergl. auch LONGWORTH (Arch. Mikr. Anat. 11. Bd. 1875 p. 655).

653. Aehnliche Objekte. Papillae foliatae: DRASCH (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 492); HERMANN (ibid. 5. Bd. 1888 p. 524); ARNSTEIN (ibid. 13. Bd. 1897 p. 240). — Riechorgane der Vertebraten: DOGIEL (Arch. Mikr. Anat. 29. Bd. 1887 p. 74). — Organe des 6. Sinnes bei den Amphibien: MITROPHANOW (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 513; hierin auch Einzelheiten über Färbung mit Wasserblau). — Nervenenden in der Zunge von *Rana*: FAJERSZTAJN (Arch. Z. Expér. (2) Tome 7 1889 p. 712; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1889 p. 357: besonders Methylen-

blau). — Zunge von *Lepus cuniculus*: Lenhossék (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 377: Methode von Ramón y Cajal, s. unten § 741).

654. Cornea. Sie lässt sich hauptsächlich auf dreierlei Art studiren: mit Methylenblau (s. oben Kapitel 15, besonders § 307), mit Silber und mit Gold.

Negative Bilder der Corneazellen erhält man leicht nach Klein, indem man von der lebenden Cornea das Epithel der Conjunctiva abpinselt und nun die Cornea mit einem Stifte von Höllenstein gut bestreicht. Nach 1 Stunde untersucht man die Cornea in destillirtem Wasser. — Um positive Bilder der fixirten Zellen zu gewinnen, macerirt man nach Ranvier (Traité 1. Ed. p. 863) die cauterisirte Cornea in Wasser; hierbei findet eine sekundäre Imprägnation statt. — Oder man cauterisirt (nach His 1862) die Cornea am lebenden Thiere, lässt sie aber noch 2—3 Tage auf dem Auge, bevor man sie ausschneidet, oder man behandelt die negativ imprägnirte mit schwachem Salzwasser oder verdünnter Salzsäure.

Die besten positiven Bilder liefert Goldchlorid. Ranvier (l. c. p. 864) zieht seine Methode mit Citronensaft (§ 370) allen anderen vor; die Cornea darf jedoch nicht zu lange im Goldbade bleiben, sonst imprägniren sich nur die Nerven gut. — S. auch § 886 (Königstein).

Renaut (C. R. Acad. Sc. Paris Tome 90 1880 p. 137) legt die Cornea von *Rana* auf 10 Minuten in 20%ige Ameisensäure, dann auf 24 Stunden in 1%iges Goldchlorid und ebenso lange in 33%ige Ameisensäure. — Die Methode von Hoyer s. oben p. 237.

Rollett (Strickers Handbuch p. 1115) empfiehlt die doppelte Imprägnation, um negative Goldbilder zu erhalten (s. oben § 363). Ferner setzt er (p. 1102) eine frische Cornea in Humor aqueus den Dämpfen von Jod aus und entfernt das Epithel, sobald sie braun geworden ist; die Corneazellen werden so kaum minder deutlich als mit Goldchlorid. — Zur Isolirung der Fasern macerirt er die Cornea in einer Lösung von Kaliumhypermanganat (Stärke wird nicht angegeben) oder in einem Gemisch davon mit Alaun. Ist sie braun geworden, so schüttelt er sie in einem Reagensglase mit Wasser.

Tartuferi (Anat. Anzeiger 5. Jahrg. 1890 p. 524; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 346) macht die Corneazellen und ihre Ausläufer mit Natriumhyposulfit und Chlorsilber deutlich.

655. Kristalllinse. Löwe (Arch. Mikr. Anat. 15. Bd. 1878 p. 557) härtet sie in Kaliumbichromat; das dauert aber wenigstens 1½ Jahr. — Auch Formaldehyd ist dazu brauchbar (Gebhardt in: Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 306). — Man macerirt sie entweder in Schwefelsäure (oben § 539) oder in Salpetersäure oder Drittelalkohol etc.

Rabl (Zeit. Wiss. Z. 65. Bd. 1898 p. 272) fixirt das rein präparirte Auge $^1/_2$ Stunde lang in seinem Platinchlorid- oder Pikrinsäure-Sublimat (§ 65 u. 69), schneidet es im Aequator durch und legt die vordere Hälfte auf 24 Stunden in das Fixirgemisch zurück.

S. auch *Robinski, Zur Kenntniss der Augenlinse und deren Untersuchungsmethoden. Berlin 1883.

---

26. Kapitel.

Methoden zur Untersuchung der Muskeln und der Nervenenden darin und in den Sehnen.

Quergestreifte Muskeln.

656. Muskelzellen. Hierüber und über verwandte Objekte s. unter Anderem BEHRENS, KOSSEL & SCHIEFFERDECKER, Das Mikroskop 2. Bd. 1891 p. 154 ff.; ROLLETT (*Denkschr. Akad. Wien 49. Bd. 1885 p. 81; *51. Bd. 1886 p. 23; *53. Bd. 1887 p. 193; Arch. Mikr. Anat. 32. Bd. 1888 p. 235); KÖLLIKER (Zeit. Wiss. Z. 47. Bd. 1888 p. 694); ferner über die Verwendung von Goldlösungen zum Studium der Muskelzellen SCHÄFER (Proc. R. Soc. London Vol. 49 1891 p. 281).

RUTHERFORD (Journ. Anat. Phys. London Vol. 31 1897 p. 314) fixirt die quergestreiften Muskeln in 10%igem Formol 48 Stunden lang und bringt sie dann direkt in Alkohol von 90% oder zerzupft sie nach Zusatz von 50%iger Essigsäure oder in Eisessig selber. — M'DOUGALL (ibid. p. 432) fixirt die Muskeln entweder in Normalsalzwasser durch Wasserdampf oder mit 10%igem Formol oder 2%iger Chromsäure. — ROUGET (*Arch. Phys. Paris 29. Année 1897 p. 677) fixirt die quergestreiften Muskeln (sammt ihren Nervenendplatten) in 25%iger Lösung von Kochsalz wenigstens 2 Tage lang und behandelt sie später, um sie wieder durchsichtig zu machen, mit $^{1}/_{10}$%iger Salzsäure.

Zur Isolirung des Sarkolemms zerzupft SOLGER (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 189) den frischen Muskel in kalt gesättigter Lösung von Ammoniumkarbonat.

657. Dissociation. S. oben im Kapitel 21, besonders § 517, 536 u. 537.

658. Nervenenden. Zum Studium der Nervenenden im Muskel sind die 3 Hauptmethoden die mit Methylenblau, mit Gold und mit Silber. S. hierüber § 659—661.

659. Nervenenden. Die Methode mit **Methylenblau.** Allgemeines hierüber s. oben im Kapitel 15. — BIEDERMANN (s. § 303, ferner Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1891 p. 65) imprägnirt bei *Astacus* die Muskeln

mit Methylenblau, öffnet das Thier und lässt die Muskeln in einer feuchten Kammer 2—6 Stunden lang an der Luft liegen, um die Färbung zu differenziren. Die besten Resultate geben die Rumpf- und Schwanzmuskeln. In *Hydrophilus piceus* injizirt B. eine $^1/_2$ % ige Lösung von Methylenblau ventral zwischen die hintersten Abdominalringe, lässt die Thiere im Wasser noch 3—4 Stunden leben, öffnet den Thorax durch zwei seitliche Schnitte, nimmt die Muskeln der Vorderbeine heraus, legt sie 3—4 Stunden lang in einer feuchten Kammer an die Luft und untersucht sie in Salzwasser.

Gerlach (Sitzungsb. Akad. München 19. Bd. 1889 p. 125; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 220) injizirt einem Frosch durch die Abdominalvene oder Aorta 4—5 ccm einer Lösung von 1 g Methylenblau in 400 ccm. 1% igem Salzwasser und untersucht die Muskeln (besonders die am Kopfe oder Auge) im Serum des Thieres, fixirt die Präparate in Ammoniumpikrat und schliesst sie in Glyceringelatine ein. — Die Methode von Dogiel s. oben im § 303.

660. Nervenenden. Die **Vergoldung.** Nach Kühne (*Zeit. Biol. 23. Bd. 1887; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 495) sind die besten Methoden die von Löwit und die von Golgi sowie Kühnes Abänderungen beider Methoden. (S. oben § 368 u. 374.)

Aehnlich wie Löwit verfährt Biedermann (s. § 659) an *Astacus*, lässt aber die Vorbehandlung mit Ameisensäure fort und legt die Muskeln nach der Reduktion in der Säure auf einige Tage in Glycerin. — Aehnlich Trinchese (Mem. Accad. Bologna (5) Tomo 2 1892 p. 279; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 238). — Ranvier (Traité 1. Ed. p. 813) empfiehlt für die motorischen Enden der Batrachier seine Methode mit Citronensaft (§ 370). Auch die motorischen Platten von Fischen, Reptilien, Vögeln und Säugern kommen (p. 826) mit seiner Ameisensäure (§ 369) besser heraus, als nach Löwit, noch besser aber mit Citronensaft, besonders bei Eidechsen und Säugern. — S. auch die Methoden von Apáthy (oben § 373 u. 375).

661. Nervenenden. Die **Versilberung.** Ranvier (ibid. p. 810) behandelt nach Cohnheim ein Stück vom Gastrocnemius des Frosches nach sorgfältigem Zerzupfen in frischem Serum 10—20 Sekunden lang mit einer Lösung von Höllenstein (2 bis 3 : 1000) und bringt es in destillirtem Wasser an helles Licht, am besten in die Sonne. Ist es schwarz oder braun geworden, so wird es auf so lange in 1 % ige

Essigsäure gelegt, bis es wieder die normale Dicke erlangt hat (es war im Höllenstein geschrumpft). Zur Beobachtung kommt es in Glycerin und Wasser zu gleichen Theilen. Man erhält negative Bilder (Muskeln braun, Nervenenden farblos).

662. Nervenenden. Andere Methoden (Genaueres s. zum Theil in den früheren Auflagen der englischen Ausgabe): Bremer (Arch. Mikr. Anat. 21. Bd. 1882 p. 195); Boccardi und Ciaccio (s. oben § 372); Wolff (Arch. Mikr. Anat. 19. Bd. 1881 p. 331); Sachs (ibid. p. 339); Krause (Internation. Monatschr. Anat. Hist. 1. Bd. 1884 p. 200; 5. Bd. 1888 p. 68; Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 547); Sihler (Arch. Mikr. Anat. 46. Bd. 1895 p. 709; Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1895 p. 202: Zeit. Wiss. Z. 68. Bd. 1900 p. 324: Maceration, dann neue Art der Färbung mit Hämateïnthonerde); Ramón y Cajal (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 332: rasche Methode von Golgi); Marshall (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 31 1890 p. 73): Mays (Zeit. Biol. 20. Bd. 1884 p. 449; Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 242).

Sehnen.

663. Sehnen. Retterer (C. R. Soc. Biol. Paris (10) Tome 5 1898 p. 580) fixirt die Sehnen 24 Stunden lang mit Pikrinsublimat (gleiche Theile der konzentr. Lösungen), legt sie dann zur Entfernung des Mucins auf 1—3 Tage in gesättigte Lösung von Pikrinsäure, der 2—3 % »Sel marin« zugesetzt sind, und bringt sie von da in Paraffin.

664. Golgische Körperchen. Ranvier (Traité 1. Ed. p. 929) reinigt die Sehnen der M. gemini des Kaninchens von den Muskeln, behandelt sie mit Goldchlorid und Ameisensäure (oben § 369) und schabt nach der Reduktion des Goldes mit einem Messer über sie hin, um die Muskelfasern zu entfernen, die die Körperchen verdecken. — Marchi (*Arch. Sc. Med. Torino Vol. 5 No. 15) legt das Auge mit seinen Muskeln auf wenigstens 3 Tage in 2 %ige Lösung von Kaliumbichromat, präparirt die Muskeln und Sehnen ab, färbt sie mit Gold und Osmium nach Golgi oder nach Manfredi (s. oben p. 237) und untersucht sie in Glycerin. — Cattaneo (Arch. Ital. Biol. Tome 10 1888 p. 338) empfiehlt Gold und Arsensäure nach Golgi (oben p. 239), Ruffini (Atti Accad. Lincei Rend. (5) Vol. 1 1892 Sem. 1 p. 444; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 237) die Methode von Löwit (oben § 368).

Ciaccio (Mem. Accad. Bologna (4) Tomo 10 1890 p. 301; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1891 p. 507) legt die Sehnen von Amphibien in $^1/_{10}$%ige Salzsäure oder $^1/_5$%ige Essigsäure, bis sie durchsichtig werden, dann auf 5 Minuten in eine Lösung von je 1 g Goldchlorid und Chlorkalium in 1 Liter Wasser, dann wieder

zurück in die Essigsäure auf 24 Stunden im Dunkeln und auf 2—4 Stunden in der Sonne. Sind sie violett geworden, so legt er sie auf 24 Stunden in eine $^{1}/_{10}$ %ige Osmiumsäure, endlich in Glycerin, das mit $^{1}/_{2}$ %iger Essigsäure oder Ameisensäure versetzt ist.

Glatte Muskeln.

665. Probe auf glatte Muskeln. Fixirt man nach Retterer (C. R. Soc. Biol. Paris (8) Tome 4 1887 p. 645) das Gewebe in einem Gemisch von 10 Vol. 90 %igen Alkohols und 1 Vol. Ameisensäure, wäscht es gut und färbt es 24—36 Stunden lang mit Alaunkarmin, so hat sich das Plasma der glatten Muskeln roth gefärbt, während das Bindegewebe gequollen und ungefärbt ist. — S. auch § 669, 767 u. 883.

666. Isolirung der Fasern. Schwalbe (Arch. Mikr. Anat. 4. Bd. 1868 p. 394) macerirt die glatten Muskeln in schwacher Chromsäure (gewöhnlich in 0.02 %). Diese ist besser als Osmiumsäure oder 1 %ige Essigsäure (Moleschott), schwache Schwefelsäure, Holzessig (Meissner), 20 %ige Salpetersäure (Reichert) oder endlich 32—35 %ige Kalilauge (Moleschott), da sie die feinere Struktur der Zellen besser erhält.

Schultz (Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1895 1896 p. 521) legt die glatten Muskeln von Wirbelthieren auf 24 Stunden in 10 %ige Salpetersäure, isolirt kleinere Stücke davon, spült sie flüchtig mit Wasser ab und bringt sie auf 6—8 Tage (zuerst im Dunkeln) in frische Hertwigsche Osmiumessigsäure ($^{1}/_{20}$ %ige Osm. und $^{1}/_{5}$ %ige Ess. zu gleichen Theilen). Dann zerzupft er die Stücke und schliesst sie in verdünntes Glycerin ein.

Die Methoden von Gage s. oben § 517, 530 und 536.

667. Glatte Muskeln von Säugethieren. Werner (Hist. d. glatten Muskulatur Dorpat 1894 p. 22) fixirt die Muskeln des Darmkanales oder der Harnblase gedehnt in Flemmings Gemisch (Formol ist nicht gut) 8—48 Stunden lang, wäscht sie erst in fliessendem, dann in 30° C. warmem destillirtem Wasser aus und färbt sie hauptsächlich mit Hämatoxylin und Kaliumchromat nach R. Heidenhain. Auch die Versilberung nach Böhm oder Oppel (unten § 743) ist brauchbar, desgleichen zur Darstellung der Intercellularräume die Imbibition mit Oel: frische Darmstücke werden 4 Stunden lang bei 37° C. in Oel gehalten, kommen dann auf 12 Stunden in Flemmings Gemisch und auf 4—6 Stunden in Chromessigsäure.

668. Glatte Muskeln von Wirbellosen. Apáthy (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 36 und 319) gibt eine ausführliche Darstellung der Muskeln der Würmer, besonders von den optischen Eigenschaften der Fibrillen. Seine Macerationsmethode s. oben im § 538.

Ueber die Muskeln von *Cardium* s. § 528 (Möbius), die der Cephalopoden Ballowitz (Arch. Mikr. Anat. 39. Bd. 1892 p. 291).

669. Spezifische Färbung für glatte Muskeln. Unna (Monatsh. Prakt. Dermat. 19. Bd. 1894 p. 533; Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 243) färbt Schnitte 10 Minuten lang in polychromem Methylenblau, wäscht sie mit Wasser, fixirt die Farbe durch 1 %ige Lösung von rothem Blutlaugensalz (10 Minuten lang) und differenzirt sie durch etwa ebenso langes Einlegen in Alkohol mit 1 % Salzsäure, bis das Collagen weiss wird. Zuletzt absoluter Alkohol, Oel, Balsam. — Unna gibt am gleichen Orte eine Methode zur Färbung mit saurem Orceïn, Hämalaun, Säurefuchsin und Pikrinsäure an.

S. auch Schaffer (Zeit. Wiss. Z. 66. Bd. 1899 p. 236: wesentlich Säurefuchsin mit Pikrinsäure sowie Pikronigrosin nach Freeborn).

670. Iris. Dogiel (Arch. Mikr. Anat. 27. Bd. 1886 p. 403) bringt die vordere Hälfte eines Auges mit der Iris auf einige Tage in ein Gemisch von 2 Theilen Drittelalkohol und 1 Theil ½ % iger Essigsäure. Dann lässt sich die Iris isoliren und vom Rande her in eine vordere und eine hintere Schicht spalten, die man nach den gewöhnlichen Methoden färbt.

Koganei (Arch. Mikr. Anat. 25. Bd. 1885 p. 1) macerirt die Iris lange Zeit in Müllerschem Gemisch, entfernt das Pigmentepithel mit einem Pinsel oder bleicht es mit Chlorwasser, das man aber nur einige Stunden lang wirken lassen darf, bis das Pigment hellbraun geworden ist, weil bei längerer Wirkung des Chlors die Gewebe leiden. — S. auch Canfield (Arch. Mikr. Anat. 28. Bd. 1886 p. 121) und Dostoiewsky (ibid. p. 91).

671. Regeneration der glatten Muskeln im Magen von *Triton*. Stilling & Pfitzner (Arch. Mikr. Anat. 28. Bd. 1886 p. 396) fixiren den operirten und verheilten Magen durch Einspritzen von und Einlegen in ¼ %ige Chromsäure, schneiden nach 3—4 Stunden das regenerirte Stück heraus, bringen es auf 1—2 Tage in die Chromsäure zurück, waschen es gut mit Wasser aus, härten es mit Alkohol nach, färben es nach abermaligem Auswaschen in Safranin und bringen es durch Alkohol, Nelkenöl und Xylol in Xylolbalsam. Solche Präparate werden später durch Xylol etc. zurück in Delafields Hämatoxylin ge-

bracht und erhalten nun eine scharfe Kernfärbung, während diese „beim frisch gehärteten Präparat" nicht gelingt.

672. Innervation der Harnblase von *Rana*. Wolff (Arch. Mikr. Anat. 19. Bd. 1881 p. 362) injizirt einem getödteten Frosch eine Lösung von Goldchlorid (1 : 20000) durch den Anus in die Blase. (Falls sie nach der Wegnahme der Spritze wieder ausfliesst, so binde man dem Frosch die Schenkel zusammen.) Dann öffnet er den Frosch, legt die Blase nach Unterbindung und Freilegung auf 4 Stunden in eine Goldlösung von 1 : 2000, öffnet sie, spannt sie auf Kork, wäscht oder pinselt das Epithel ab, legt das Präparat auf 24 Stunden in Goldchlorid (1 : 6000), wäscht es in destill. Wasser aus, stellt es in angesäuertem Wasser auf einige Zeit ins Dunkle und reduzirt das Gold in reinem Wasser am Licht. — Ranvier (Traité 1. Ed. p. 854) empfiehlt natürlich seine beiden Goldmethoden (§ 369 u. § 370); die Blase muss aber durch Injektion vom Anus her mit Citronensaft oder dem Gemisch von Goldchlorid und Ameisensäure prall gefüllt sein.

Ueber die Methode der Vergoldung von Bernheim s. oben p. 238.

27. Kapitel.

Methoden zur Untersuchung der Nerven. Einleitung. Schneiden. Cytologisches.

673. Allgemeines. Die histologische Erforschung des Nervensystems verfolgt zwei Zwecke: entweder will man den feineren Bau der Elemente, d. h. der Nervenzellen und Nervenfasern, kennen lernen, und dazu gebraucht man cytologische Methoden; oder man möchte die Form der Nervenzellen, ihre Anordnung in der Grauen Masse und die Verbindungen zwischen den Gruppen der Nervenzellen (den sogenannten Kernen) erforschen und den komplizirten Verlauf der Faserbündel verfolgen, die die Weisse Masse des Centralnervensystems zusammensetzen helfen, und dieses sind die anatomischen Methoden der Neurologie.

Bekanntlich existirt keine scharfe Scheidung zwischen dem centralen und dem peripheren Nervensystem, und da nun auch die wichtigsten neurologischen Methoden sich zum Studium des gesammten Nervensystems eignen, so wäre eine formelle Unterscheidung in dieser Richtung hier nicht rathsam. Immerhin sind aber die drei folgenden Kapitel hauptsächlich dem Centralnervensystem gewidmet, indessen nur deswegen, weil viele von den Methoden für das periphere System schon ausführlich in den Kapiteln von dem Methylenblau, den Imprägnationsmethoden, der Haut und den Muskeln und Sehnen behandelt worden sind. Auf diese sei also hier ausdrücklich verwiesen. Zunächst seien nun behandelt die speziellen Methoden zum Härten, Schneiden etc., sowie die cytologischen Methoden; dann folgen in Kapitel 28 und 29 die anatomischen Methoden.

Genaueres über das Seciren und Härten so voluminöser Gehirne wie das des Menschen oder grösserer Wirbelthiere überhaupt findet man in *Mercier,

Les coupes du système nerveux central (Paris 1894); DEJERINE, Anatomie des centres nerveux (Paris 1895); *LEWIS, The Human Brain (London 1. Ed. 1882) und *OBERSTEINER, Anleitung beim Studium des Baues der nervösen Centralorgane (3. Aufl. Leipzig u. Wien 1896).

674. Freilegung des Nervensystems kleinerer Wirbelthiere. LANGERHANS (Arch. Mikr. Anat. 12. Bd. 1876 p. 291) legt *Amphioxus* auf 3 Tage in 20%ige Salpetersäure, dann auf 24 Stunden in Wasser und schüttelt ihn zuletzt tüchtig. So lässt sich das ganze Nervensystem fast bis zu den feinsten peripheren Nervenzweigen isoliren. — SCHWALBE (Jena. Zeit. Naturw. 13. Bd. 1879 p. 178) verfährt bei der Untersuchung des Ganglion oculomotorii ähnlich mit den frischen Köpfen (oder ganzen Thieren) von *Salamandra* und *Rana*, nur schüttelt er sehr vorsichtig und präparirt die Nerven lieber rein; die Säure verwendet er auf etwa 35° C. erwärmt (2 Tage lang), da sie sonst leicht das Bindegewebe härtet, statt es zu zerstören. Nach kurzer Behandlung mit absol. Alkohol lassen sich die Präparate gut mit Karmin färben. — S. auch § 886.

Zur Verfolgung der Nerven von Fischen giesst DOBBERKE (Verslag der onderzoekingen [etc.] Zoöl. Station te Napels 1886 p. 3) auf die möglichst freigelegte Stelle des frischen Thieres $^1/_2$ %ige Essigsäure, wäscht sie nach 1—2 Minuten mit Salzwasser ab, legt nun Filtrirpapier, das mit $^1/_5$—1 %iger Osmiumsäure getränkt ist, auf und findet nach 5—10 Minuten die Nerven schwarz auf hellgelbem Grunde. Dickere Stücke behandelt er erst mit 1%iger Essigsäure, wäscht sie gut aus, räuchert sie über 5%iger Osmiumsäure, bringt endlich durch Essigsäure oder eine konzentrirte Auflösung von Citronensäure das Bindegewebe zum Quellen und präparirt es von den geschwärzten Nerven ab. — NUSSBAUM (Verh. Anat. Ges. 9. Vers. 1895 p. 27) verfährt ähnlich. — S. auch OTTENDORFF (Arch. Mikr. Anat. 53. Bd. 1898 p. 135).

Die Methode rührt von mir (MAYER) her: ich habe damit die Flossennerven von Selachiern präparirt (Mitth. Z. Stat. Neapel 6. Bd. 1886 p. 234). Essig- oder Citronensäure haben mir auch zum bequemen Verfolgen feiner Gefässe, die mit Berlinerblau injizirt waren, gedient (ibid. 8. Bd. 1888 p. 313). — GEBERG (Internation. Monatschr. Anat. Hist. 1. Bd. 1884 p. 8) räuchert zur Darstellung der Nerven die einige Stunden lang mit Essigsäure behandelte Uvea mit Osmiumsäure.

675. Fixiren durch Injektion. Während natürlich von ordentlichem Fixiren des Nervensystems des Menschen nicht die Rede sein kann,

lassen sich in das von lebendigen anderen Wirbelthieren die Fixirmittel injiziren, dringen daher rascher ein als bei einfachem Einlegen. Diese Methode hat wohl zuerst Golgi angegeben (Arch. Ital. Biol. Tome 7 1886 p. 30): er injizirte eine $^1/_2$ $^0/_0$ ige Lösung von Kaliumbichromat durch die Carotis, wenn er das Gehirn, und durch die Aorta, wenn er das Rückenmark härten wollte.

Quervain (Arch. Path. Anat. 133. Bd. 1893 p. 489; Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 507) verfährt ähnlich, nur lässt er erst das Blut aus der Carotis ausfliessen und injizirt dann etwa eben so viel warmes Müllersches Gemisch (so bei Hunden 300—600 ccm, bei Katzen nur $^1/_8$—$^1/_2$ davon). Das Gehirn kommt dann auf einige Wochen bei 37 °C. in Müllers Gemisch. — Ueber das Verfahren von Mann (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 482) s. oben p. 21. — Strong (Anat. Anzeiger 11. Bd. 1896 p. 655) injizirt ein Gemisch von Formalin und Wasser zu gleichen Theilen durch die Carotis, bis es aus der Jugularis herausströmt, nach einigen Minuten nochmals, und so noch 1 oder 2 Mal. Soll nur nach der Golgischen Methode gearbeitet werden, so nimmt er statt des Wassers eine 10$^0/_0$ige Lösung von Kaliumbichromat.

Härten.

676. Gefrierenlassen. Wohl nur durch Gefrierenlassen mittels Aethers lassen sich gute Schnitte durch frisches Nervengewebe erzielen. Die Schnitte behandelt man 1 Minute lang auf dem Objektträger mit $^1/_4$ $^0/_0$ Osmiumsäure. (Näheres s. in Lewis, The Human Brain.) — Goodall (*Brit. Med. Journ. 1893 p. 947; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1893 p. 405) schneidet gefrorenes Rückenmark, lässt die Schnitte auf Wasser schwimmen, nimmt sie rasch heraus, saugt das Wasser ab und bringt sie auf Pyridin, wäscht sie $^1/_4$—1 Stunde später mit Wasser, färbt sie in einer $^1/_4$ $^0/_0$igen Lösung von Anilin Blue-Black, dann mit Pikrokarmin, entwässert sie in Pyridin und schliesst sie in Pyridinbalsam ein. (S. auch § 104.)

677. Härten in Reagentien. Allgemeines. Falls grosse Stücke zu härten sind, so schneide man sie in Scheiben von nur wenigen Millimetern Dicke, lege sie auf Watte in ein Gefäss und giesse das Härtmittel darauf; so kann dieses von allen Seiten herandringen, und die Watte verhindert zugleich durch ihre Elastizität, dass sich die Scheiben durch ihr eigenes Gewicht werfen. Auch kann man die Stücke in oder auf der Watte dicht unter der Oeffnung eines Cylinderglases aufhängen, um die Diffusion des Fixirmittels noch mehr zu erleichtern. Jedenfalls dürfen die Stücke einander nicht bedecken. Will man das Objekt

nicht in Scheiben zerlegen, so schneide man es wenigstens in den gleichgültigeren Theilen tief an. Am besten entfernt man zunächst wohl nur die Dura und erst später, wenn die Härtung schon fortgeschritten ist, auch die anderen Häute theilweise oder ganz. Das Rückenmark, verlängerte Mark und die Varolsbrücke kann man in toto härten, und zwar entfernt man die Dura sofort und hängt das Präparat in einem Cylinder auf, befestigt auch unten ein Gewicht daran, damit es nicht auf dem Härtgemisch schwimme und sich nicht durch die elastischen Fasern in der Pia und Arachnoidea krümme. Das Hirn legt man auf die Watte oder hängt es darin eingehüllt auf, bringt auch Bäusche in die Windungen, so weit das geht, und schneidet es sagittal durch. Betz (s. unten § 680) empfiehlt, schon nach einigen Stunden die Pia und die Choroidealplexus zu entfernen, jedoch erfordert das wohl eine geübte Hand.

Die Härtung wird durch erhöhte Temperatur meist sehr beschleunigt. So werden nach Weigert (Centralbl. Med. Wiss. 20. Jahrg. 1882 p. 819) bei 39—40° C. die Präparate in Müllers Gemisch schon in 8—10 Tagen und in Erlickis Gemisch schon in 4 Tagen gut, jedoch ist es keineswegs sicher, dass das Schnellhärten auch die besten Resultate liefert. Nach Sahli (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 3) ist das bei den Chromaten nicht der Fall und sollte daher nicht mehr geschehen. Andererseits wirken bei gewöhnlicher Temperatur die Chromate so langsam, dass die Gewebe sich ein wenig zersetzen mögen, ehe noch das Härtmittel seine Schuldigkeit thun kann. Will man daher voluminöse Objekte langsam härten, so sollte man sie jedenfalls kühl stellen, am besten in einen Eisschrank.

Flatau (Anat. Anzeiger 13. Bd. 1897 p. 327) fertigt Längsschnitte durch das ganze Rückenmark von *Canis* in folgender Weise an. Das Rückenmark wird in einem Glascylinder voll Müllers Gemisch (oder zunächst auf 1 Tag lang voll 10%igem Formol) aufgehängt, wobei die Cauda equina mit einem Glasstabe beschwert wird, um Krümmungen zu vermeiden. Nach 1 Tag wird die Dura ventral und dorsal gespalten, nach 2—3 Wochen das Rückenmark selber in der Medianlinie, sodass beide Hälften nur noch am Conus medullaris zusammenhangen. Es kommt dann auf 3—5 Wochen in Marchis Gemisch (unten § 707), wird in Celloidin eingebettet, auf einem besonderen Stücke Holz von 35—40 cm Länge und 5 cm Breite, das bereits eine Celloidinplatte trägt, mit Celloidin befestigt und in Schnitte von 60—80 μ Dicke zerlegt.

678. Die Härtmittel. Von der Chromsäure ist man jetzt ziemlich zurückgekommen, da sie zwar rascher, aber auch ungleichmässiger wirkt als die chromsauren Salze, auch häufig die Gewebe brüchig

macht. Die Osmiumsäure kann leider nur bei Stücken von höchstens 1 ccm Grösse verwandt werden, so vorzüglich sie auch sonst ist. Das Gemisch von Erlicki wirkt zwar rascher, als die anderen Chromverbindungen, jedoch kommt Sahli (l. c.) nach vergleichenden Studien zu dem Schlusse, dass man am besten mit reinem Kaliumbichromat (3—4 %ige Lösung) in der Kälte härtet. Ebenso Obersteiner, der allerdings für die feinsten Einzelheiten empfiehlt, in Fols Gemisch (oben p. 35) 24 Stunden lang zu fixiren, dann mit Wasser auszuwaschen und in 80 %igem Alkohol zu härten.

Da die chromsauren Salze so langsam eindringen, so behandelt man oft zweckmässig die Objekte zuerst 24 oder mehr Stunden lang mit 80—90 %igem Alkohol und legt sie dann erst in das Härtgemisch.

Nach Fish (The Wilder Quarter Century Book 1883 p. 335) und Donaldson (Journ. Morph. Boston Vol. 9 1894 p. 123) nimmt das Gehirn von *Ovis* in Kaliumbichromat an Gewicht und Volumen zu, in allen anderen Härtmitteln hingegen ab.

Ueber den Formaldehyd s. oben § 108 sowie unten § 681 u. 744. Nach Flatau (Anat. Anzeiger 13. Bd. 1897 p. 323) nimmt in 10%iger Formollösung das Gehirn nur ganz unwesentlich an Gewicht zu (das Rückenmark bis zu 14%), in 1%iger dagegen bis zu 23%.

Die Chromsäure wird nur selten allein benutzt (s. oben p. 32), wohl aber in den unten zu erwähnenden Gemischen; sie beschleunigt, in ganz geringen Dosen (1—2 Tropfen einer 1%igen Lösung auf 30 ccm) dem Kaliumbichromat zugesetzt, die Härtung, ohne zu schaden. — 10—12%ige Salpetersäure gibt besonders zähe Präparate. — Neutrales Bleiacetat in 10%iger Lösung konservirt nach Kotlarewski (Mitth. Nat. Ges. Bern f. 1887 1888 p. 17; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 387) die Ganglienzellen ausgezeichnet. — Trzebiński (Arch. Path. Anat. 107. Bd. 1887 p. 3; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 497) hat die Ganglienzellen im Rückenmark von *Canis* und *Lepus* am besten durch 8 tägige Härtung in konzentrirter Sublimatlösung und nachträgliche Behandlung mit ½%iger alkoholischer Jodlösung erhalten. Aehnlich Diomidoff (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 499): er härtet kleine Stücke vom Gehirn 5—9 Tage in Sublimat und legt sie dann auf je 24 Stunden in Alkohol von 50, 70 und 96%. Ohlmacher (*Journ. Exp. Med. Vol. 2 1897 p. 673) fixirt die Objekte in seinem Gemisch (s. oben § 62d). Gewöhnlich genügen 15—20 Minuten; Menschenhirne erfordern 18—24 Stunden. Auswaschen in Alkohol von 80% mit Kampher oder Jodtinktur. — Ueber Chlorzink s. unten § 681 u. 682.

S. im Uebrigen § 687 ff.

679. Stärke der Härtgemische. Mit Ausnahme der Osmiumsäure sollte man alle Gemische zunächst so schwach nehmen, wie sich mit der Konservirung des Gewebes verträgt, und dann allmählich verstärken. Osmiumsäure von 1% härtet nach Exner (unten § 706)

kleine Stücke in 5—10 Tagen. Bei Kaliumbichromat beginnt man mit einer 2 %igen Lösung und bringt sie für Rückenmark und Grosshirn auf 3—4, für das Kleinhirn auf 5%. Obersteiner (p. 8) fängt mit 1 % an und steigt in 6—8 Wochen (bei gewöhnlicher Temperatur, bei 35—45 ° C. hingegen in 1—2 Wochen) langsam auf 2—3 %. Von Ammoniumbichromat nimmt man zuerst nur die halbe Stärke des Kalisalzes oder noch weniger und steigt für das Kleinhirn bis zu 5 %.

680. Härtung nach Betz (Arch. Mikr. Anat. 9. Bd. 1893 p. 101). Sie besteht im Wesentlichen darin, dass man das Mark nach Abpräparirung der Dura in einem Cylinder mit 75—80 %igem Alkohol, der durch Jod hellbraun gemacht ist, aufhängt, nach 1—3 Tagen auch die beiden anderen Häute entfernt und unter stetem Ersatz des absorbirten Jods die Objekte noch etwa 6 Tage im Alkohol lässt, um sie schliesslich in 3 %igem Kaliumbichromat an einem kühlen Orte so lange zu härten, bis sich auf ihnen ein brauner Niederschlag absetzt. Nun werden sie mit Wasser gewaschen und in $^1/_2$—1 %igem Kaliumbichromat aufgehoben. Das Kleinhirn legt man auf Watte und behandelt es ähnlich, verwendet aber das Bichromat in 5 %iger Lösung. Das Grosshirn halbirt man sagittal und härtet es zuletzt in einer 4 %igen Lösung.

681. Härtung in Formaldehyd. Weigert (Abh. Senckenberg. Ges. Frankfurt 19. Bd. 1895 p. 199) legt Stücke von nicht über 5 mm Dicke auf 4 Tage in Formol 1 : 10. — Marcus (*Neur. Centralbl. 14. Jahrg. 1895 p. 4; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 241) härtet Rückenmark 2—4 Wochen lang in $^1/_2$ %igem Formalin, schneidet Stücke von 5 mm Dicke heraus und legt sie auf 1 Woche bei 37 ° C. in Müllers Gemisch, dann in 95 %igen und absoluten Alkohol, um sie in Celloidin zu schneiden. — van Gieson (Anat. Anzeiger 10. Bd. 1895 p. 494) hat mit gutem Erfolg »4, 6 und 10 %iges Formalin« und darauf 95 %igen Alkohol benutzt. Das Myelin hält sich gut darin und gibt auch die blaue Reaktion mit Hämatoxylin nach Weigert (unten § 701). — Lachi (Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 32) hat ebenfalls gute Resultate mit »20 %igem Formol« erzielt.

Fish (Trans. Amer. Micr. Soc. Vol. 17 1896 p. 319) empfiehlt folgendes Gemisch: Wasser 2000, Formalin 50 ccm, Chlornatrium 100, Chlorzink 15 g. Ein Gehirn lässt man darin 8—10 Tage oder noch länger und bewahrt es dann in 2 $^1/_2$ %igem

Formalin in einem gut geschlossenen Gefässe auf. Ein Menschenhirn verlor darin nach 14 Tagen nur 6,8 % an Gewicht, während ein anderes nach 1 Woche in 50 %igem und 1 Woche in 70 %igem Alkohol 22 % einbüsste.

Nach PARKER & FLOYD (Anat. Anzeiger 11. Bd. 1895 p. 156) härtet im Gemisch von 1 Vol. Formol und 49 Vol. Wasser ein Schafhirn in 7—10 Tagen vollständig, vermehrt aber dessen Volumen bis um 40 %. Daher setzt man besser zu 2 Vol. des obigen Gemisches 3 Vol. Alkohol von 95 %; das Hirn wird darin eben so rasch gut, nimmt aber an Umfang kaum zu und kann Monate lang darin bleiben (ibid. 1896 p. 568).

MARINA (Riv. Pat. Nerv. Ment. Firenze Vol. 2 1897 p. 20; Neur. Centralbl. 16. Jahrg. 1897 p. 166) fixirt Stücke vom Centralnervensystem 4—8 Tage lang in einem frischen Gemisch von 100 ccm 90 %igem Alkohol, 5 ccm Formol und 0,1 g Chromsäure, wechselt das Gemisch täglich, wäscht sie dann mit 45 %igem Alkohol aus und schneidet sie ohne Einbettung unter 90 %igem. Die Schnitte lassen sich eben so gut nach Nissl wie nach Held oder Weigert färben.

GEROTA (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 314) bringt das Gehirn von *Homo* in eine 5—10 %ige wässerige Lösung von Formol, zieht nach 24 Stunden die Pia ab, ersetzt die Flüssigkeit durch neue und so noch alle 5—7 Tage; in 1—2 Wochen ist die Härtung beendet. Handelt es sich um embryonale Gehirne von *Canis, Felis* und *Homo*, so injizirt er (p. 315) zuerst das Gefässsystem mit einer 10—15 %igen Lösung von Formol in 85 %igem Alkohol und bringt dann den Kopf in die obige 5—10 %ige Lösung; nach 1—2 Tagen nimmt er das Hirn aus dem Schädel heraus und legt es von Neuem auf 15—20 Tage in die Lösung.

Ueber das Gemisch von Orth s. oben § 109a. — SIEMERLING (Neur. Centralbl. 18. Jahrg. 1899 p. 472; Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd. 1900 p. 470) zieht es dem einfachen Formol nach Weigert vor, da dieses, wenn man die Objekte zu lange darin lässt, gute Färbungen erschwert. Aber auch nach dem Gemisch von Orth muss man noch mit Müllers Gemisch nachhärten und die Schnitte mit Chromsäure (½ %ig) beizen.

S. ferner § 678 und 744.

682. Härtung des Hirns in anderen Gemischen. LEWIS (*Human Brain p. 102) legt es im Kühlen auf 24 Stunden in Alkohol von 90 %, dann in Müllers Gemisch, wechselt die Flüssigkeit nach 3 Tagen, darauf nach 5 Tagen nochmals, oder ersetzt sie besser durch eine 2 %ige Lösung von Kaliumbichromat. Am Ende der zweiten Woche setzt er eine 4 %ige Lösung zu, und wenn noch eine Woche später das Hirn sich nicht schneiden lassen will, so legt er es in eine Lösung von Chromsäure.

Hamilton (Journ. Anat. Phys. London Vol. 12 1878 p. 254) legt Scheiben des Grosshirns auf Watte in ein abgekühltes Gemisch von 3 Theilen Müllerschem Gemisch und 1 Theil Alkohol von 90%, setzt das Gefäss in einen Eisschrank, dreht die Scheiben am folgenden Tage um, wechselt die Lösung nach 2—3 Wochen und bringt die Scheiben entweder dann oder schon früher, sobald das Gemisch gut eingedrungen ist, in eine Lösung von Ammoniumbichromat (1:400), die nach je 1 Woche durch eine 1%ige und 2%ige ersetzt wird. Definitive Aufbewahrung in einer Lösung von Chloralhydrat (1 : 40).

Duval (Journ. Anat. Phys. Paris Tome 12 1876 p. 497) legt das Hirn in eine 2½%ige Lösung von Ammoniumbichromat, wechselt diese nach 1 Tage und nochmals nach 2—4 Tagen, ersetzt sie nach 2—3 Wochen durch schwache Chromsäure (3:1000) und wechselt diese die 1. Woche lang alle Tage, dann aber bis zur Mitte des 2. Monats alle 8 Tage. Das Hirn muss wenigstens 2 Monate in der Flüssigkeit bleiben, der man gegen das Schimmeln etwas Kampher zusetzt.

Fish (Wilder Quarter Cent. Book 1893 p. 393) legt das Hirn auf etwa 3 Tage in ein Gemisch von Wasser und 95%igem Alkohol je 400 ccm, Glycerin 250 ccm, Chlorzink und Chlornatrium je 20 g; wenn es angeht, injizirt er auch die Gefässe damit; dann bringt er das Hirn auf 1 Woche oder länger in ein Gemisch der obigen Flüssigkeit und von 70%igem Alkohol zu gleichen Theilen, und zum Schluss in 90%igen Alkohol.

683. Für das **Kleinhirn** von *Canis* empfiehlt Berkley (*J. Hopkins Hosp. Rep. Vol. 3 1893 p. 195; Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 388) das Einlegen in Flemmings Gemisch auf 24—36 Stunden, dann absoluten Alkohol und Celloidin. — S. auch § 681 (Gerota) sowie Smirnow (Arch. Mikr. Anat. 52. Bd. 1898 p. 201: Formol und Müllers Gemisch).

684. Nervensystem von niederen Wirbelthieren. Mason (Whitman, Methods p. 196) nimmt für Amphibien und Reptilien Jodalkohol 6—12 Stunden lang, dann eine 3%ige Lösung von Kaliumbichromat (mit etwas Kampher darauf) 6—10 Wochen lang, erneuert diese aber alle 14 Tage.

Burckhardt (Centralnerv. *Protopterus* Berlin 1892 p. 8; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 347) legt den Kopf von *P.* auf 1—2 Tage in ein Gemisch von 1 Theil Salpetersäure, 1 Theil 2%iger Osmiumsäure und 30 Theilen 1%iger Chromsäure; dann lässt sich das Hirn leicht herausnehmen, worauf es in 1%iger Lösung von Chlornatrium 12 Stunden lang ausgewaschen und in Alkohol gebracht wird.

Fish (Journ. Morph. Boston Vol. 10 1895 p. 234) fixirt das Hirn von *Desmognathus* 12—24 Stunden lang in 100 ccm 50 $^0/_0$ igem Alkohol mit 5 ccm Eisessig, 5 g Sublimat und 1 g Pikrinsäure.

Herrick (Arch. Neur. Psychopath. Utica Vol. 2 1899 p. 44) fixirt den Kopf des Knochenfisches *Menidia* mit dem Gehirn in situ 2—3 Wochen lang in häufig zu erneuerndem Gemisch von Flemming und bringt ihn später in Paraffin. (Zur Färbung nach Weigert beizt er die Schnitte mit Kupferacetat.) — S. auch Herrick in: Contr. Path. Inst. New York State Hosp. Vol. 1 & 2 1898 N. 20.

Einbetten und Schneiden.

685. Einbetten. In Paraffin lassen sich sehr grosse Objekte nur mit viel Aufwand an Zeit und Mühe einbetten. Das Rückenmark des Menschen steht schon an der Grenze: es lässt sich noch gut durchtränken, wenn man es vorher in Scheiben von höchstens einigen Millimetern — am besten nur 1 mm — Dicke schneidet. Ganze Menschenhirne wirklich gut in Paraffin einzubetten, scheint noch nicht gelungen zu sein, selbst Strasser nicht mit seinen Methoden (s. § 686); man begnügt sich daher wohl mit der Anbringung eines Mantels von Paraffin um das Gehirn. Mittelgrosse Objekte kann man in Kollodium bringen, was die sicherste und für die Behandlung der Schnitte vortheilhafteste Art der Einbettung ist.

Wirkliches Einbetten ist nicht absolut nöthig, nur muss das Material dann sehr gut gehärtet sein. Man klebt ein passendes Stück davon mit dicker Gummilösung auf Holz oder Kork, legt es, sobald es anklebt, in Alkohol von 80 $^0/_0$ (um das Gummi zu härten), spannt es in das Mikrotom ein und schneidet es. — S. auch Schlagenhaufer (Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1899 p. 319: Gipsmantel).

Beim Kollodium kann es vorkommen, dass es die Gewebe nicht ordentlich durchtränkt hat. Immerhin erhält man noch gute Schnitte, wenn man (nach Duval) die Schnittfläche des Stückes durch Blasen darauf trocken legt, dann mit einem Pinsel eine dünne Schicht Kollodium darauf streicht und, so wie dies etwas angetrocknet ist, den Schnitt macht.

Als Marke zum Orientiren eines zu schneidenden Rückenmarkes lehnt Feist (Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1892 p. 492) ein Stäbchen gehärteter Leber von etwa 1 Quadratmillimeter Breite an die Stelle, die er kennzeichnen will, und bettet es mit ein.

686. Methoden von Strasser für sehr grosse Schnitte. Strasser (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 8) kann mit seinem Schnitt-Aufklebe-Mikrotom Objekte von 10 cm Breite, 15 cm Länge und 6 cm Dicke schneiden. Er legt nun (ibid. 12. Bd. 1895 p. 160) in das Fixirgemisch (Formalin oder dieses und Chromatlösung) das Gehirn entweder in toto, oder in Scheiben von 3—4 cm Dicke geschnitten, ein und schneidet erst nach der Härtung in Alkohol Scheiben von 1—2 cm Dicke heraus, um diese einzubetten. Sollen sie in Paraffin kommen, so legt er sie erst in Karbolxylol (s. § 168), lässt dieses abdunsten, bringt sie dann in gelbes Vaselin und zum Schluss in ein Gemisch von Paraffin (42° Schmelzpunkt) und Vaselin oder in reines Paraffin, je nach der Grösse. Die in Celloidin eingebetteten Scheiben durchtränkt er vor dem Schneiden mit einer Mischung von Karbolxylol und 80%igem Alkohol zu gleichen Theilen. — S. auch Dejerine, Anat. Centres Nerv. Tome 1 1895 p. 29.

Cytologisches.

687. Allgemeines. So weit beim Studium des Nervensystems die allgemeinen Prinzipien der Untersuchung der Zelle zur Anwendung kommen, sei hier auf Kapitel 24 verwiesen. Die folgenden §§ behandeln spezielle Fälle. S. übrigens auch Kapitel 29a sowie Mann (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 479), Heimann (Arch. Path. Anat. 152. Bd. 1898 p. 301) und Lenhossék (Neur. Centralbl. 17. Jahrg. 1898 p. 577: gegen Heimann).

688. Allgemeine Methoden für Nervenzellen. Mann (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 487 und 490) verwendet entweder die gewöhnlichen Färbmethoden (mit Hämateïnthonerde etc.) oder ein Gemisch von 2 Theilen einer 1%igen wässerigen Lösung von Methylblau, 9 Th. einer ebensolchen von Eosin und 20 Th. Wasser mit nachträglicher Differenzirung in ganz schwach alkalischem absol. Alkohol und Waschung mit schwach essigsaurem Wasser. — S. auch § 689 (Mann).

Held (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1895 1896 p. 399) färbt aufgeklebte Paraffinschnitte durch Hirn von Säugern zuerst unter leichtem Erwärmen 1—2 Minuten lang in Erythrosin (1 g des von Grübler bezogenen Salzes auf 150 g destill. Wasser und 2 Tropfen Eisessig), wäscht mit Wasser aus, färbt mit Methylenblau (gleiche Theile des Nisslschen Gemisches, s. unten § 689, und einer 5%igen Acetonlösung) unter starkem Erwärmen so lange nach, bis der Geruch nach Aceton

vergangen ist, lässt den Objektträger erkalten und differenzirt mit Alaunlösung (1 : 1000), bis die Schnitte wieder röthlich erscheinen, spült in Wasser ab, entwässert möglichst rasch in absol. Alkohol und schliesst durch Xylol in Benzinkolophonium ein. Je nach der Konservirung des Hirns (in 96 %igem Alkohol, Pikrinschwefelsäure. Chromsäure etc.) fallen die Bilder ganz verschieden aus, da die sogen. Nisslschen Körper in der lebenden Zelle nur als Stoffe vorhanden sind. die von den Fixirmitteln mehr oder weniger körnig ausgefällt werden. — Ueber leichte Aenderungen in dieser Methode sowie über Methoden zur Fixirung des feineren Baues der Nervenzellen von Wirbelthieren s. HELD in Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. 1897 p. 226—233.

LENHOSSÉK (Fein. Bau d. Nervensystems 2. Aufl. Berlin 1894 p. 149) fixirt die Stücke 2 Tage lang in 50%igem Formol, legt sie dann auf ebenso lange in absol. Alkohol, bettet sie in Celloidin oder Paraffin ein, färbt die Schnitte 5 Minuten lang in einer konzentr. wässerigen Lösung von Thionin, spült sie mit Wasser ab, differenzirt sie im Gemisch von absol. Alkohol (9 Theile) und Anilin (1 Theil) und führt sie durch Cajeputöl und Xylol in Dammar oder Balsam über. Die Färbung ist nicht haltbar.

LENHOSSÉK (Neurol. Centralbl. 17. Jahrg. 1898 p. 582) fixirt mit Rabls Pikrinsublimat (oben § 65); zum Färben ist am besten Toluidinblau, eventuell eine leichte Nachfärbung mit Erythrosin. — Aehnlich BOCCARDI (Monitore Z. Ital. Anno 10 1899 p. 141) und HARRIS (Philadelphia Med. Journ. 1898; Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd. 1899 p. 64).

SADOWSKY (C. R. Soc. Biol. Paris (10) Tome 3 1896 p. 353) fixirt kleine Stücke von Menschenhirn (etwa 1/2 ccm gross) 3—4 Tage lang in einer „solution aqueuse de Formol à 10 p. 100“, bringt sie direkt auf 2 Tage in Alkohol von 96%, dann auf 3 Tage in absoluten, bettet sie in Celloidin ein und färbt die Schnitte, da er die Methode von Nissl (unten § 689) für zu komplizirt und launisch hält, mit Methylenblau oder Fuchsin in folgender einfacher Weise. In der 1%igen Lösung von Methylenblau verweilen die Schnitte 1/4 Stunde bis zu mehreren Stunden, in der konzentr. Lösung des Fuchsins in Karbolwasser (5 : 100) nur 1/2—3 Minuten: in beiden Fällen werden sie auf dem Objektträger mit 1%iger Essigsäure so lange behandelt, bis die graue und weisse Substanz deutlich hervortreten, dann in absol. Alkohol völlig differenzirt und durch Xylol in Balsam gebracht. Das Fuchsin färbt schärfer als das Methylenblau.

REHM (*Münchener Med. Wochenschr. 39. Jahrg. 1892 p. 217; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 390) färbt die Schnitte einige Minuten lang in konzentr. wässeriger Lösung von Congoroth, behandelt sie 10 Minuten lang mit saurem Alkohol (Salzsäure oder Salpetersäure), bis sie blau werden, und bringt sie durch Origanumöl in Balsam. Oder einfacher: man färbt die Schnitte von Material aus Alkohol 1—2 Tage lang in einer wässerigen 1/2%igen Lösung von

Hämatoxylin, wäscht sie mit einer Lösung von Lithiumkarbonat, bis sie keine Farbe mehr abgeben, entwässert sie und legt sie in Balsam. Auch können sie mit einer $^1/_{10}$%igen wässerigen Lösung von Bismarckbraun einige Minuten lang nachgefärbt werden.

Rosin (Neur. Centralbl. 17. Jahrg. 1898 p. 600) färbt nach dem Vorgang von Juliusburger (*ibid. 16. Jahrg. 1897 p. 259) mit einer konzentrirten Lösung von Neutralroth: alles Basophile wird roth, alles Acidophile gelb. Fixirung der Objekte am besten mit 4%igem Formol.

Ueber die Färbung der Mitosen nach Weigert s. oben § 263.

689. Methoden zur Darstellung der Schollen (Tigroidkörper). Nach Nissl (Centralbl. Nervenheilk. Psych. 17. Bd. 1894 p. 341; *Neur. Centralbl. 13. Jahrg. 1894 p. 781; Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 79; ibid. 13. Bd. 1896 p. 237) wird frisches Material in Alkohol von 90 % gehärtet und uneingebettet geschnitten. Die Schnitte kommen in einem Uhrglase in eine Lösung von 15 Theilen Methylenblau und 7 Theilen venetian. Seife in 4000 Theilen Wasser, das auf 65—70° C. erwärmt wird, bis Dämpfe aufsteigen, dann zur Differenzirung in ein Gemisch von 1 Theil wasserhellem Anilin und 9 Theilen Alkohol von 96 %. Verlieren sie keine Farbe mehr, so werden sie auf dem Objektträger mit Papier abgetrocknet, mit Cajeputöl durchtränkt, wieder abgetrocknet, mit einigen Tropfen Benzin behandelt und in Benzinkolophonium (§ 435) so lange erhitzt, bis alles Benzin verdampft ist.

Die ältere Methode von Nissl zum Färben mit Dahlia, Fuchsin oder Vesuvin ist kurz angegeben im Tagebl. 58. Vers. D. Naturf. Aerzte 1885 p. 506.

van Gehuchten theilt mir (Lee) eine einfachere Methode mit. Die mit Wasser aufgeklebten Paraffinschnitte werden in Nissls Gemisch 5—6 Stunden lang bei 35—40° C. gefärbt, nach Nissl differenzirt und in Xyloldammar eingeschlossen. — S. auch van Gehuchten (*Trav. Lab. Neur. Univ. Louvain 1898 p. 119).

Ilberg (Neur. Centralbl. 15. Jahrg. 1896 No. 18) färbt die Hirne kleinerer Thiere oder Stücke der Hirne grösserer Thiere im Methylenblau von Nissl 5—10 Tage lang, wäscht sie 2—3 Tage in 96%igem Alkohol aus, bettet sie in Paraffin ein, bringt die nicht aufgeklebten Schnitte durch Xylol in Alkohol von 96% und, falls sie sich darin nicht genug differenziren, in das Anilingemisch, von da in absol. Alkohol, Xylol und Xylolbalsam. Das Anbrennen nach Nissl ist unnöthig.

Gothard (C. R. Soc. Biol. Paris (10) Tome 5 1898 p. 530) färbt die Celloidinschnitte mit Unnas polychromem Methylenblau (§ 774) und differenzirt sie in einem Gemisch von je 5 ccm Kreosot und Xylol, 4 ccm Cajeputöl und 16 ccm absol. Alkohol. — Aehnlich Luithlen & Sorgo (Neur. Centralbl. 17. Jahrg. 1898 p. 640), aber

Differenzirung nach Unna mit Glycerinäther, und MARCUS (Zeit. Heilk. Wien u. Leipzig 21. Bd. 1900 4. Heft).

Andere Modifikationen s. bei TELJATNIK (*Neur. Centralblatt 15. Jahrg. 1896 p. 1129; Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 79) und LORD (*Journ. Ment. Sc. 1898; Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd. 1899 p. 59).

MANN (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 489) färbt die Paraffinschnitte zuerst mit Eosin in 1 %iger wässeriger Lösung, dann mit Toluidinblau in $^1/_2$ %iger oder mit Methylenblau in 4 %iger Lösung.

S. auch oben § 688 (HELD und ROSIN).

690. Methoden für Spinalganglienzellen. COX (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 498) fixirt die Spinalganglien zur Demonstration des fibrillären Baues ihrer Zellen 1—3 Tage lang in einem Gemisch von entweder 30 Th. gesättigter Sublimatlösung, 10 Th. 1 %iger Osmiumsäure und 5 Th. Eisessig, oder 15 Th. gesätt. Subl., 10 Th. 1 %iger Osm., 2 Th. Eisessig und 15 Th. 5 %iger Lösung von Platinchlorid, bringt die aufgeklebten Paraffinschnitte auf 8 Stunden in eine 20—25 %ige Tanninlösung, wäscht sie und beizt sie entweder mit Brechweinstein, um sie mit Indoinblau BB und Alaun zu färben, oder mit Eisenammoniumsulfat, um sie mit Methylenblau und Kaliumkarbonat zu färben. — S. auch COX (Anat. Hefte 1. Abth. 10. Bd. 1898 p. 98: im 1. Härtgemisch statt der Osmiumsäure Formol; ferner zum Färben Baumwollblau BB statt Indoinblau).

BÜHLER (Verh. Physik. Med. Ges. Würzburg (2) 31. Bd. 1898 p. 316) fixirt mit Flemmings Gemisch oder gesättigter Lösung von Sublimat (allein oder mit 2—10 % einer 1 %igen Osmiumsäure). Zum Färben der Schnitte dient Methylenblau (nachher Erythrosin, Eosin oder Säurefuchsin) oder »ein Gemisch von Anilinblau und Rubin S zu ungefähr gleichen Theilen« (statt des letzteren auch Bordeauxroth) oder sogar 4 Farbstoffe (!). Nissls Methode sei unnöthig komplizirt.

VAN GEHUCHTEN & NELIS (La Cellule Tome 14 1898 p. 374) fixiren $^1/_2$ Stunde lang mit Gilsons Sublimatsalpetersäure (neuere Formel, s. § 64) und färben die Paraffinschnitte mit Toluidinblau.

TIMOFEEW (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 15. Bd. 1898 p. 260) fixirt Spinalganglien und Sympathicus von *Gallus* und *Columba* mit Carnoys (oben § 82, Formel 2) oder Zenkers Gemisch und färbt mit Toluidinblau und Erythrosin nach Lenhossék (§ 687).

S. auch oben § 687.

691. Methoden für den Sympathicus. Eve (Journ. Phys. Cambridge Vol. 20 1896 p. 341) fixirt die sympathischen Ganglien von *Lepus* 4—16 Stunden lang in Sublimat, wäscht sie einige Stunden mit Wasser, mehrere Tage mit immer stärkerem Alkohol, bettet sie durch Cedernöl in Paraffin (55° Schmelzp.) ein und färbt die mit Wasser aufgeklebten Schnitte 24 Stunden lang in einem Gemisch von 50 ccm konzentr. wässeriger Lösung von Methylenblau, 5 g Eosin, 70 ccm Alkohol [von 90 %?] und 130 ccm Wasser, wäscht sie mit absol. Alkohol ganz hell und bringt sie durch Toluol in Balsam. (Zur Kernfärbung verwendet er Pikrokarmin und nachher Methylenblau.)

S. auch § 690 (Timofeew).

692. Struktur der markhaltigen Fasern. Zur Demonstration des Axencylinders und der Schwannschen Scheide kann man das Myelin entfernen, und zwar entweder durch Kochen der Fasern mit Natronlauge (und Neutralisiren) oder mit einem Gemisch von Aether und absolutem Alkohol unter Zusatz von etwas Aetznatron, oder mit Eisessig oder mit rauchender Salpetersäure (und Neutralisiren); oder (nach Kuhnt in: Arch. Mikr. Anat. 13. Bd. 1877 p. 442) durch Behandeln der mit Osmiumsäure fixirten Präparate mit Eau de Javelle oder schwachem Ammoniak; oder (nach van Gehuchten in litt.) einfach durch längeres Einlegen in Alkohol und Aether. — Ueber das Myelin s. auch Gad & Heymans (Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. für 1890 p. 531) und Wlassak (Arch. Entwickelungsmech. 6. Bd. 1898 p. 453).

693. Neurokeratin. Färbung nach Galli (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 467) mit Chinablau, nach Platner (ibid. 6. Bd. 1889 p. 186) mit Echtgrün (Dinitrosoresorcin; Fixirung der Nerven mit Eisenchlorid; s. auch Beer in: Jahrb. Psychiatrie 11. Bd. 1893 1. Heft). Darstellung durch Verdauen nach Gedoelst (La Cellule Tome 3 1887 p. 171, Tome 5 1889 p. 136; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 57). — S. auch Cox (Anat. Hefte 1. Abth. 10. Bd. 1898 p. 101: Ausziehen des osmirten Myelins aus den Paraffinschnitten durch Bergamottöl) und Corning (Anat. Anzeiger 17. Bd. 1900 p. 309: Eisenhämatoxylin).

694. Andere Methoden für markhaltige Nerven. Ranvier, Traité 1. Ed. p. 718 ff.; Rezzonico (*Arch. Sc. Med. Torino 1879 p. 237); Tizzoni (ibid. 1878 p. 4: Kochen in Chloroform, Färben, Einlegen in Glycerin); Boveri (Abh. Akad. München 15. Bd. 2. Abth. 1885 p. 424; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 91); Jakimovitch (Journ. Anat. Phys. Paris 23. Année 1888 p. 142: imprägnirt den Axencylinder mit Höllenstein und reduzirt in Ameisensäure und Amylalkohol, s. § 357); Schiefferdecker (Behrens, Kossel & Schiefferdecker, Mikroskop 2. Bd. p. 227); Huber (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 394: Safranin und Lichtgrün nach Benda); Rabl (ibid. 11. Bd. 1894 p. 42: die Frommannschen Linien sind

Artefakte); Fischel (ibid. p. 48: Resultat ähnlich); Tirelli (ibid. 11. Bd. 1894 p. 391); Segall (Journ. Anat. Phys. Paris 29. Année 1893 p. 586); Marchesini (Anat. Anzeiger 12. Bd. 1896 p. 211: Sublimat und Schwefelkalium); Mönckeberg & Bethe (Arch. Mikr. Anat. 54. Bd. 1899 p. 150: Versilberung nach Boveri).

695. Axencylinder. Kupffer (Sitzungsb. Akad. München 13. Bd. 1884 p. 470; Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 106) befestigt einen Nerven gedehnt auf Kork, behandelt ihn 2 Stunden lang mit 1/3 %iger Osmiumsäure, wäscht ihn 2 Stunden lang mit Wasser, färbt ihn 24—28 Stunden lang mit gesättigter Lösung von Säurefuchsin, wäscht ihn 6 bis höchstens 12 Stunden lang mit absolutem Alkohol, bringt ihn durch Nelkenöl in Paraffin und erhält dann auf den Schnitten den Axencylinder als ein Bündel rother Fibrillen. — S. auch die komplizirten Methoden von Auerbach (Neur. Centralbl. 16. Jahrg. 1897 p. 439; Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 402; 15. Bd. 1899 p. 493) und Mönckeberg & Bethe (unten § 710).

696. Färbung der Neurofibrillen mit Hämateïnthonerde nach Apáthy (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1897 p. 712). Die Objekte (beliebige Thiere, also auch wirbellose) können mit irgend welchen Fixirgemischen behandelt worden sein (nur nicht heiss!), also mit Sublimat, Sublimat-Essigsäure etc., Zenkerschem Gemisch, Pikrinschwefelsäure u. s. w., falls diese eine gute Färbung mit Hämateïnthonerde nicht unmöglich machen. Aufbewahrt müssen sie in 90 %igem Alkohol werden. Zum Durchfärben dürfen die Stücke nicht dicker als 5 mm sein. Sie kommen nun auf mindestens 48 Stunden (selten auf länger als 72) in die Hämateïnlösung IA (oben § 252) und werden dann in absolut reinem destillirtem Wasser, das man öfter erneuert, bis zu 24 Stunden lang ausgewaschen, wobei man sie am besten im Wasser aufhängt. Die Dauer des Waschens variirt und muss für jedes Objekt ausprobirt werden. Ehe nun auch aus den Neurofibrillen die Farbe entweicht, fixirt man sie durch Einlegen des Stückes in Brunnenwasser auf 3 – 5 Stunden, bringt die Objekte auf höchstens 2 Stunden in destillirtes Wasser zurück, entwässert sie sofort möglichst rasch, indem man sie in recht viel absolutem Alkohol aufhängt, und bettet sie ebenfalls schleunigst in Paraffin (durch Chloroform) oder Celloidin oder Glycerinleim ein (oben § 153); hierbei muss man die Objekte, während sie in Chloroform oder den Celloidinlösungen sind, vor dem Licht schützen. Will man die Objekte in Celloidin nicht sofort schneiden, so hebt man sie in Glycerinleim auf wie bei der Goldmethode. Die Schnitte bringt man in ein Harz oder in neutrales Glycerin.

697. Färben mit Hämatoxylinkupfer. Viallanes (Ann. Sc. N. (7) Tome 13 1892 p. 354) fixirt die Augen von *Palinurus* in Sublimat und Essigsäure

(Subl. 5, Ess. 5, Wasser 100), bringt sie direkt in Alkohol von 70%, entpigmentirt sie in einem Gemisch gleicher Theile von absol. Alkohol, Glycerin und Wasser durch Einleiten von Chlorgas, legt sie auf 12 Stunden in eine 1%ige Lösung von Kupfersulfat, wäscht sie 5—6 Stunden lang in destillirtem Wasser aus und bringt sie auf 12 Stunden in eine frische Lösung von 1 g Hämatoxylin in 100 ccm absolutem Alkohol und 300 ccm gutem destillirtem Wasser. Darauf kommen sie nochmals eben so lange in das Kupferbad, werden von Neuem gründlich gewaschen, entwässert und durch Chloroform in Paraffin gebracht. Die Schnitte schliesst man in Chloroformbalsam ein, worin sich die blaue Farbe der Axencylinder, des Plasmas und der Kerne der Nervenzellen einige Monate lang hält. - Nach Binet (Journ. Anat. Phys. Paris 30. Année 1894 p. 476) muss man die Ganglien in toto nach Viallanes behandeln, kann aber die Schnitte mit Safranin nachfärben, das dann zunächst vom Bindegewebe aufgenommen wird. — S. auch § 701 und 702.

698. Ueber die **Vergoldung** nach Apáthy s. oben p. 233, 238 u. 239.

699. Färbung der Neurofibrillen mit Toluidinblau. Bethe (Zeit. Wiss. Mikr. 17. Bd. 1900 p. 13) gibt ausführliche Anweisungen zu seiner neuesten Methode. 1. Vertebraten (p. 22). Er legt die Nerven absichtlich, um nicht Alles zu fixiren, auf 24 Stunden in 3—7½%ige Salpetersäure (von 1.40 spez. Gew.), von da auf 12—24 Stunden in Alkohol von 96%, dann in schwach ammoniakalischen Alkohol (1 : 12), dann wieder in angesäuerten (1 Th. Salzsäure, 3 Th. Wasser, 8—12 Th. Alkohol) und zum Schluss in neutralen, aber stets bei Temperaturen von höchstens 20° C. Nun durch Wasser auf 24 Stunden in eine 4%ige Lösung von Ammoniummolybdänat (bei höchstens 30° C.), nach dem Abspülen mit Wasser in Alkohol von 96° und von da auf die gebräuchliche Weise in Paraffin. (Für Zellen mit vielen Fibrillen ist eine andere Vorbehandlung der Nerven nöthig, s. p. 25). Die Behandlung der mit Eiweiss aufgeklebten Schnitte ist schwierig: den Objektträger mit den Schnitten erwärmt man 2—10 Minuten lang mit destill. Wasser auf 55—60° C., giesst das Wasser ab, lässt ebenfalls 10 Minuten lang in der Wärme eine wässerige Lösung von Toluidinblau (1 : 3000) auf die Schnitte wirken und wäscht mit 96%igem Alkohol aus; dann durch Xylol in Balsam. Statt des Wassers kann man die Schnitte auch mit einer Lösung von Ammoniummolybdänat (1 : 2500—5000) behandeln.

2. Evertebraten (p. 33). Die Nerven von *Hirudo* werden mit Sublimat fixirt, mit Jodalkohol ausgewaschen, die Paraffinschnitte bei 25—30° C. 10 Minuten lang mit 1%iger Lösung von Ammoniummolybdänat gebeizt, ebenso lange gewaschen und 5 Minuten lang bei

58 ° C. mit Toluidinblau (1 : 3000) gefärbt. Zur Darstellung der Fibrillen ist die Fixirung etc. wie bei den Vertebraten, Behandlung der Schnitte (vor dem Färben) mit schwachem Ammoniak (1 : 500—2000) oder mit Natriumkarbonat (1 : 1000 — 3000 in 50 %igem Alkohol). *Carcinus* und *Astacus* werden besser mit einem Gemisch konzentr. Lösungen von Pikrinsäure (3 Th.) und Ammoniumpikrat (1 Th.) fixirt.

---

28. Kapitel.

Methoden zur Untersuchung der Nervenfasern.

a) Färbung des Myelins.

700. Allgemeines. Die wichtigsten Methoden zum Studium des Verlaufes der markhaltigen Nervenfasern sind die von Weigert mit Hämatoxylin. Davon ist die eine 1884, die folgende 1885 und die dritte 1891 publizirt worden. Während nun die gewöhnliche Färbung durch Hämatoxylin auf einer Verbindung des Hämateïns mit Thonerde beruht, liegt bei den Weigertschen eine solche mit Chrom oder mit Kupfer vor, die das Myelin in ganz spezifischer Weise färben und sich noch dazu erst in den Geweben bilden. Im Einzelnen sind diese Methoden theils durch WEIGERT selber, theils durch Andere sehr modifizirt worden, und so ist die von 1884 (Fortschr. Med. 2. Bd. 1884 p. 113, 190; Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 290, 564), wobei es sich um eine Verbindung mit Chrom handelt, gegenwärtig wohl überholt. Nicht so die beiden neueren, die auf der Bildung von Hämateïnkupfer beruhen. — HEIDENHAIN (Arch. Mikr. Anat. 43. Bd. 1894 p. 432) konstatirt ausdrücklich, dass die »Weigertsche Nervenfärbung ganz vorzüglich unter Zugrundelegung des Hämateïns geräth«.

S. auch WEIGERT (Anat. Hefte 2. Abth. 6. Bd. 1897 p. 3), BOLTON (Journ. Anat. Phys. London Vol. 32 1898 p. 247; Vol. 33 1899 p. 297), der geradezu leugnet, dass das Myelin spezifisch gefärbt werde, und HERRICK (Contr. Path. Inst. New York State Hosp. Vol. 1 & 2 1898 N. 20).

701. Weigerts Methode von 1885. (*Fortschr. Med. 2. Bd. 1884 p. 190; 3. Bd. 1885 p. 236; Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 399; Anat. Hefte 2. Abth. 6. Bd. 1897 p. 10). Man härtet die Gewebe in einer Lösung von Kaliumbichromat oder dem Gemisch von Müller, Kultschitzky oder Zenker, aber nur so lange, bis die Gewebe erst braun, nicht schon grün geworden sind (die grünen sind indessen auch

zu brauchen, wenn sie überhaupt nur einmal gut braun gewesen sind). Man kann nun, braucht es aber nicht, das Objekt in Celloidin einbetten, auf einen Kork aufkitten und wie gebräuchlich härten; jedenfalls bringt man es auf 1—2 Tage in eine halbgesättigte Lösung von neutralem Kupferacetat, und zwar in einem Brütofen. Hierdurch wird das Gewebe grün, das Celloidin bläulich grün. Die Schnitte legt man in ein Gemisch von Hämatoxylin $^3/_4$—1 g, Alkohol 10 g, Wasser 90 g und konzentrirter Lösung von Lithiumkarbonat 1 g oder in eine wässerige Lösung von Hämateïn ohne Alkali; sind es solche vom Rückenmark oder der Markschicht des Hirns, so bleiben sie darin 2 Stunden, solche von der Hirnrinde hingegen 24 Stunden. Dann wäscht man sie mit Wasser und entfärbt sie in einem Gemisch von Borax 4 g, rothem Blutlaugensalz 5 g und Wasser 400 g je nach dem Gewebe eine halbe bis mehrere Stunden lang, wäscht sie wieder und bringt sie durch Alkohol etc. in Balsam. Auch kann man sie der Kerne wegen vorher mit Alaunkarmin färben. — S. auch Gelpke (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 484).

Die Gewebe dürfen in Alkohol oder sonstwie gehärtet sein, wenn sie nur in einem chromsauren Salz gebräunt worden sind, bevor sie in die Kupferlösung kommen. Flesch (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 50) bringt aber nicht das ganze Objekt, sondern erst die Schnitte in das Kupferbad, wäscht sie dann mit 70%igem Alkohol aus und legt sie in das Hämatoxylingemisch. — Paneth (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 213) verwendet statt des Hämatoxylins Extrakt von Blauholz; Breglia (Giorn. Ass. Med. Natural. Napoli Anno 1 1889 p. 169; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 236) ebenfalls oder das von Fernambukholz. — S. auch die Methode von Berlinerblau (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 50) zur Regeneration der Färblösung.

Gerota (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 315) färbt Schnitte von Rückenmark nach Weigert in folgender Weise. Er löst 3 g Hämatoxylin in 30 g absol. Alkohol, fügt 100 g einer 1%igen Alaunlösung hinzu, lässt 10 Tage stehen und färbt mit diesem Gemisch die Schnitte bei 37° C. wenigstens 4, besser 24 Stunden lang, bringt sie nach dem Abspülen mit Wasser auf 2 Stunden in das Kupferacetat (bei 37° C.) und differenzirt sie dann.

Die Resultate dieser Methode von Weigert sind sehr schön: die blauschwarzen Nerven treten auf dem goldigen Grunde lebhaft hervor. Auch eignet sie sich gleich gut für das periphere wie für das centrale Nervensystem und ist ferner auf Lymphdrüsen, Blut und Haut anwendbar (Schiefferdecker in: Anat. Anzeiger 3. Jahrg. 1887 p. 680).

702. Weigerts Methode von 1891. (*D. Med. Wochenschr. 42. Jahrg. 1891 p. 1184; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 392). Das Material wird mit Kaliumbichromat gehärtet und in Celloidin eingebettet. Die

gehärteten Blöcke kommen in ein Gemisch gleicher Theile einer kalt gesättigten Lösung von neutralem Kupferacetat und einer 10%igen Lösung von Seignettesalz (Kaliumnatriumtartrat), und zwar auf 24 Stunden in einem Brütofen (grosse Stücke auf 48 Stunden, aber dann wird die Flüssigkeit nach 24 Stunden gewechselt). Dann auf 24 Stunden, ebenfalls im Brütofen, in eine gesättigte oder halbgesättigte Lösung von Kupferacetat, darauf zum Abspülen in Wasser, endlich in Alkohol von 70% auf wenigstens 1/2 Stunde. Nun werden Schnitte von höchstens 25 μ Dicke angefertigt und lose, nicht aufgeklebt, 24 Stunden lang bei gewöhnlicher Temperatur in einem frischen Gemisch von 9 Vol. einer schwachen Lösung von Lithiumkarbonat (7 Vol. gesättigte Lösung mit 93 Vol. Wasser) mit 1 Vol. einer 10%igen Lösung von Hämatoxylin in Alkohol belassen. (Beide Komponenten dieses Gemisches darf man vorräthig halten, jedoch die erstere nicht zu lange.) Dann wird die Färblösung abgegossen, die Schnitte werden mehrere Male mit reinem Wasser abgespült und durch 90%igen Alkohol, darauf durch ein Gemisch von Karbolsäure und Xylol oder von Anilinöl (2 Theile) und Xylol (1 Theil), endlich durch reines Xylol in Xylolbalsam gebracht (Chloroformbalsam schadet der Färbung).

Die markhaltigen Fasern treten dunkelblau auf hellem, mitunter rosenfarbenem Grunde hervor. Soll der Grund besonders farblos sein, so nimmt man statt des 2. Waschwassers eine ganz schwache Essigsäure (1/5—1/2 %). Dickere Schnitte oder Schnittserien in Celloidin differenzirt man entweder mit dieser Essigsäure oder mit dem Gemisch von Borax und rothem Blutlaugensalz (§ 701), das man aber noch verdünnt; alsdann wird allerdings der Grund gelb.

Hat das Kupfersalz nur unvollständig gewirkt (z. B. wenn man es bei gewöhnlicher Temperatur verwandt hat), so treten auch wohl lehrreiche Differenzirungen an Ganglienzellen auf; z. B. werden die Fortsätze der Purkinjeschen Zellen im Kleinhirn sehr deutlich. Indessen neigen solche Präparate nachträglich zum Schwarzwerden, was bei den gut gerathenen nicht vorkommt.

Neuerdings hat Weigert (Anat. Hefte 2. Abth. 3. Bd. 1894 p. 21) gefunden, dass sich die Präparate ohne Behandlung mit rothem Blutlaugensalz nicht gut halten. Er räth daher an, sie zwar mit Seignettesalz zu behandeln (dies verhindert die Bildung von Niederschlägen auf den Objekten), sie aber wie bei der Methode von 1885 mit rothem Blutlaugensalz zu differenziren.

703. Modifikationen der Methode von Weigert. Nach Pal (*Wiener Med. Jahrb. 1886 und 1887 p. 589; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887

p. 92 und 5. Bd. 1888 p. 88) verfährt man zuerst wie nach Weigert (§ 701), lässt aber das Kupferbad fort, und färbt auch wie nach Weigert; dann wäscht man die Schnitte mit Wasser (werden sie nicht tiefblau, so muss man zum Wasser eine Spur Lithiumkarbonat geben), bringt sie auf 20 bis 30 Sekunden in eine $^1/_4$ %ige wässerige Lösung von Kaliumhypermanganat, wäscht sie wieder und entfärbt sie in einer Lösung von je 1 g Oxalsäure und Kaliumsulfit ($K_2 SO_3$) in 200 g Wasser: in wenigen Sekunden wird die graue Substanz farblos, während die weisse blau bleibt. Nun wäscht man die Schnitte gut und kann sie auch noch mit Magdalaroth oder Eosin, oder besser mit Pikrokarmin oder Essigsäurekarmin färben (Genaueres s. im Original oder bei Behrens, Kossel & Schiefferdecker, Das Mikroskop, 1. Bd. p. 199).

Diese Methode gibt hübschere Präparate (mit farblosem Grunde) als die von Weigert, ist aber weniger leicht zu kontroliren. Die Entfärbung ist energischer und rascher als gut ist: da sie nur wenige Sekunden dauert, so kann offenbar hierbei leichter ein Irrthum begangen werden und das Resultat ganz zu nichte machen. — S. auch Döllken (Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1899 p. 443).

Marcus (*Neur. Centralbl. 14. Jahrg. 1895 p. 4; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 241) härtet Rückenmark zuerst 2--4 Wochen lang in „$^1/_2$%igem Formol“, schneidet Stücke von 5 mm Dicke heraus, legt sie auf eine Woche bei 37° C. in Müllers Gemisch, bettet sie in Celloidin ein, bringt die Schnitte auf einige Tage bis eine Woche in Müllers Gemisch zurück, wäscht sie in Spiritus und behandelt sie dann nach Pal. — S. auch oben § 681 (Marina).

Gudden (Neur. Centralbl. 16. Jahrg. 1897 p. 24) legt Celloidinschnitte von Material, das mit 5 -10%iger Formollösung und dann mit 96%igem Alkohol fixirt worden ist, auf 10 Stunden in eine 0,55%ige Chromsäure, spült sie mit Wasser ab, tränkt sie kurz mit 80%igem Alkohol und findet sie nun für die Färbung nach Weigert (und Pal) geeignet, besonders wenn man der Hämatoxlinlösung etwas verdünnte Salpetersäure hinzufügt.

Karusin und Tschernyscheff (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 354) verwenden im Verfahren von Pal die Hämatoxylinlösung von Kultschitzky (s. unten p. 367) und färben die Schnitte 24 Stunden lang.

Heilmeyer (s. Kupffer in: Sitzungsb. Ges. Morph. Phys. München 5. Bd. 1889 p. 83 u. 84) differenzirt die Färbung in den Schnitten mit Chlor, das er aus Eau de Labarraque durch Salzsäure in Freiheit setzt. — Böhm & Oppel (Taschenbuch 4. Aufl. 1900 p. 146) lassen die Salzsäure fort und nehmen auch wohl Eau de Javelle.

Kaiser (*Neur. Centralbl. 12. Jahrg. 1893 p. 363; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 249; die älteren Methoden sind ibid. 9. Bd. 1893 p. 468 referirt) legt das Material in Müllers Gemisch, schneidet es nach 2—3 Tagen in Scheiben von 2—4 mm Dicke, bringt diese auf weitere 5—6 Tage in das Fixirmittel zurück und dann auf eine Woche in das Gemisch von Marchi (unten § 707). Die Celloidinschnitte behandelt er 5 Minuten lang mit verdünntem Liq. Ferri sesquichlorati (1 Theil auf 1 Theil Wasser und 3 Theile Spiritus von 70%), wäscht

sie in Weigerts Hämatoxylin (§ 701) ab und erwärmt sie in einer frischen Portion desselben einige Minuten lang, wäscht sie mit Wasser, differenzirt sie in Pals Gemisch und neutralisirt die Oxalsäure durch ganz schwaches Ammoniak.

Bolton (Journ. Anat. Phys. London Vol. 32 1898 p. 247; Vol. 33 1899 p. 292) fixirt menschliches Hirn mit Formol, beizt die Eisschnitte mit allen möglichen Metallsalzen (Nickel, Kobalt, Uran, Eisen etc., auch Osmiumsäure), färbt sie mit Hämatoxylin nach Kultschitzky und erhält mehr die Axencylinder als die Markscheiden gefärbt. Entfärbung stets nach Pal. Besonders empfiehlt er als Beizen 1%ige Osmiumsäure, 2%ige Lösung von Eisenalaun und 2%ige Lösung von Ammoniummolybdänat.

Kultschitzky (Anat. Anzeiger 4. Jahrg. 1889 p. 223, 5. Jahrg. 1890 p. 519: von den beiden Methoden sei hier nur die zweite wiedergegeben) härtet das Material 1—2 Monate lang in Erlickis Gemisch, färbt die Celloidinschnitte in einem Gemisch von 1 g Hämatoxylin, etwas Alkohol und 100 ccm 2%iger Essigsäure und wäscht sie mit konzentrirter Lösung von Lithium- oder Natriumkarbonat; noch besser differenzirt werden sie, wenn man der Waschflüssigkeit 10% einer 1%igen Lösung von rothem Blutlaugensalz hinzufügt und sie darin einige Stunden lässt. — Wolters (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1891 p. 466) verfährt ebenso, färbt aber die Schnitte 24 Stunden lang in dem auf 45° C. erwärmten Gemisch, taucht sie dann in Müllers Gemisch und differenzirt sie nach Pal. — Kaes (ibid. 8. Bd. 1891 p. 388; *Neur. Centralbl. 1891 No. 15) färbt 2—3 Tage lang und differenzirt mehrere Male. Ob aber diese Modifikationen eine Verbesserung bedeuten, bleibt zweifelhaft. S. auch die Methoden von Mitrophanow (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 361).

Berkley (*Neur. Centralbl. 11. Jahrg. 1892 p. 270; Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 370) härtet Scheiben von höchstens 2½ mm Dicke bei 25° C. 24—30 Stunden lang in Flemmings Gemisch, bringt sie direkt in absoluten Alkohol und wechselt diesen in den ersten 24 Stunden 2 Mal. Sind sie hart genug, so bettet er sie in Celloidin und schneidet sie. Die Schnitte wäscht er mit Wasser, legt sie entweder über Nacht in eine konzentrirte Lösung von Kupferacetat oder hält sie darin bei 35—40° C. nur ½ Stunde, wäscht sie wieder, färbt sie 15 bis 20 Minuten lang bei 40° C. in Hämatoxylin (mit Lithiumkarbonat), lässt sie abkühlen und differenzirt sie 1—3 Minuten lang in Weigerts Gemisch von rothem Blutlaugensalz, das man noch mit ⅓ Vol. Wasser verdünnen kann.

Hill (Brain Pt. 73 1896 p. 1, s. auch Phil. Trans. Vol. 184 B 1894 p. 399) färbt Stücke des Centralnervensystems 24 Stunden lang in Karmalaun, schneidet sie und färbt die Schnitte mit Hämatoxylin nach Weigert, wobei er aber das Entfärbgemisch (Kaliumhypermanganat oder rothes Blutlaugensalz) nur halb so stark nimmt: Nervenzellen, Fortsätze und marklose Fasern schwarz, markhaltige blau.

704. Noch andere Modifikationen oder ähnliche Methoden. Flechsig (Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1889 p. 537; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 71: mit japanischem Rothholz); Rossi (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 182); Mercier (ibid. 7. Bd. 1891 p. 480); Haug (ibid. 7. Bd. 1890 p. 153); van Walsem (ibid. 11. Bd. 1894 p. 236; Verh. Akad. Amsterdam (2) 7. Deel 1899 No. 1); Allerhand (Neur. Centralbl. 16. Jahrg. 1897 p. 727: Beizung der Schnitte mit Eisenchlorid, nachher Gerbsäure, Differenzirung nach Pal).

705. Optische Methode für Myelin. Ambronn & Held (Ber. Math. Physik. Cl. Ges. Wiss. Leipzig f. 1895 p. 37) prüfen die frischen Nervenfasern in Normalsalzwasser mit dem Polarisationsapparat auf das Vorhandensein von Nervenmark; und zwar die peripheren Nerven einfach isolirt, von den Centralorganen hingegen Eisschnitte von 160 μ Dicke. Lichtquelle eine Auersche Gasflamme; Gipsplättchen Purpur I; als Linsen dienen C C und D D von Zeiss. An neugeborenen Kaninchen liess sich so das Auftreten des Nervenmarkes leicht erkennen.

706. Osmiumsäure. Exner (Sitzungsb. Akad. Wien 83. Bd. 3. Abth. 1881 p. 151) legt kleine Stücke von Gehirn (höchstens 1 ccm gross) in 10 mal so viel 1%ige Osmiumsäure und erneuert diese nach 2 und nach 4 Tagen: nach 5—10 Tagen sind sie gewöhnlich durch und durch hart, werden dann ausgewaschen und eingebettet. Die Schnitte bringt er auf dem Objektträger in etwas Ammoniak zum Quellen, sodass nur die Fasern schwarz bleiben. Zum Einschluss der Schnitte kann Glycerin mit Wasserglas dienen, aber nach einiger Zeit treten darin Krystalle auf. — Belloncι (Arch. Ital. Biol. Tome 6 1884 p. 405) härtet den Opticus der Säugethiere nur 14—20 Stunden lang in $^1/_2$—1%iger Osmiumsäure und behandelt die Schnitte erst 3—4 Stunden lang mit 80%igem Alkohol und dann mit Ammoniak.

707. Osmiumsäure für degenerirte Nerven. Marchi (*Riv. Sper. Freniatr. Med. Leg. 1887 p. 208; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 350) härtet die Nerven 1 Woche lang in Müllers Gemisch und legt sie dann auf einige Tage in ein Gemisch von 2 Theilen von diesem und 1 Theil 1%iger Lösung von Osmiumsäure. So färben sich nur die degenerirten Scheiden schwarz, während die normalen gelb werden. Diese Methode ist der von Weigert insofern überlegen, als sie von den degenerirten Nerven positive Bilder, die Weigertsche aber nur negative gibt.

Vassale (s. Pellizzi in: Arch. Ital. Biol. Tome 24 1895 p. 91) nimmt als 2. Gemisch 75 ccm Müllers Gemisch, 25 ccm 1%ige Osmiumsäure und 20 Tropfen Salpetersäure.

Schaffer (Neur. Centralbl. 17. Jahrg. 1898 p. 892) härtet Rückenmark 3—6 Monate lang, legt es in Marchis Gemisch auf 1 Woche und wäscht es dann gründlich 1—2 Wochen lang aus. Die Färbung nach Azoulay (unten § 708) ist nicht so gut wie die nach Marchi.

Langley & Anderson (Journ. Phys. Cambridge Vol. 24 1899 p. XXXI) härten die Objekte beliebig lange (bis zu 1 Jahr) in 2%iger Lösung von Bichromat oder in Müllers Gemisch, durchtränken sie mit Gummi + Bichromat, schneiden sie mit dem Gefriermikrotom, waschen das Gummi mit Bichromat aus und bringen die Schnitte in Marchis Gemisch.

Busch (Neur. Centralbl. 17. Jahrg. 1898 p. 476) legt die in Formol gehärteten Objekte in sein Gemisch aus Osmiumsäure und Natriumjodat (oben p. 28). damit die Färbung tiefer eindringe.

Nach Wlassak (Arch. Entwickelungsmech. 6. Bd. 1898 p. 464) weist Marchis Methode nur das Fett, Weigerts Färbung das Protagon, Osmiumsäure bei Anwendung auf frische Gewebe das Fett + Lecithin nach. — Ueber Protagon s. Le Goff (C. R. Soc. Biol. Paris (10) Tome 5 1898 p. 369).

S. auch Weigert (Anat. Hefte 2. Abth. 7. Bd. 1898 p. 3) und *Kirchgässer (D. Zeit. Nervenheilk. 12. Bd. 1898 p. 79) sowie oben § 703 (Kaiser).

708. Osmiumsäure und Gerbsäure. Azoulay (Anat. Anzeiger 10. Jahrg. 1894 p. 25; C. R. Soc. Biol. Paris (10) Tome 1 1894 p. 629) wäscht Objekte, die mehrere Monate in Müllerschem Gemisch gewesen sind, zwei Tage mit Wasser, bettet sie in Celloidin ein und schneidet sie; die Schnitte wäscht er mit Wasser, legt sie auf 5—15 Minuten in schwache Osmiumsäure (1:500 oder 1:1000), spült sie mit Wasser ab und bringt sie auf 2—5 Minuten in eine 5- oder 10%ige Lösung von Gerbsäure entweder im Ofen bei 50—55° C. oder über eine Flamme, bis Dämpfe aufsteigen. Dann wäscht er sie wieder 5 Minuten lang, färbt sie eventuell mit Karmin oder Eosin und bringt sie in Balsam. Sind die Schnitte zu dick, so muss man sie hinterher nach Pal oder mit verdünnter Eau de Javelle (1:50) behandeln. — Sind die Objekte bereits mit Osmium konservirt worden, also im Gemisch von Flemming etc., so kommen die Schnitte direkt auf 3—10 Minuten in das warme Tanninbad.

709. Osmiumsäure und Pyrogallussäure. Heller & Gumpertz (Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1896 p. 385) sowie Heller (ibid. 15. Bd. 1899 p. 495) bringen die Celloidinschnitte von Material, das in Müllers Gemisch fixirt worden ist, in 1%ige Osmiumsäure (10—30 Minuten lang), von da in Pyrogallussäure, dann zur Differenzirung in Kaliumhypermanganat und zuletzt in eine 2%ige Lösung von Oxalsäure. Die Schnitte können vor oder nach der Osmirung mit Alaunkarmin gefärbt werden. — Aehnlich Robertson (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 80).

710. Osmiumsäure und Toluidinblau. Mönckeberg & Bethe (Arch. Mikr. Anat. 54. Bd. 1899 p. 141) fixiren die in natürlicher Länge aufgespannten Nerven 24 Stunden lang mit Osmiumsäure (¼ %ige Lösung, für Seethiere mit

mit Seewasser zu bereiten), bringen sie in Wasser, dann in Alkohol von 90%, wieder in Wasser und legen sie dann auf 6—12 Stunden in eine 2%ige Lösung von Natriumbisulfit, der eben vorher auf je 10 ccm 2—4 Tropfen Salzsäure zugesetzt sind. Von da auf bekannte Weise in Paraffin. Die mit Eiweiss aufgeklebten Schnitte werden, entweder direkt oder nach Beizen mit einer 1—4%igen Lösung von Ammoniummolybdänat, mit Toluidinblau (1 : 1000) gefärbt, ähnlich wie nach Bethe (oben § 699).

711. Osmiumsäure und Pikrinsäure. Finotti (Arch. Path. Anat. 143. Bd. 1896 p. 169) bringt die Schnitte von Objekten aus Müllers Gemisch auf 4—10 Stunden in ein frisches Gemisch von konzentrirter Pikrinsäurelösung in Alkohol von 30% (3—2 Theile) und 1%iger Osmiumsäure (1 Theil), dann in Wasser, darauf in Alauncochenille.

712. Silbernitrat. Vastarini-Cresi (Atti Accad. Med. Chir. Napoli Anno 50 1896) härtet Rückenmark in Formol, schneidet es in dicke Scheiben, wäscht diese mit 40%igem Alkohol aus, legt sie im Dunkeln in $^3/_4$- oder 1%ige Lösung von Höllenstein (in Alkohol von 40 oder 70%), wäscht sie sorgfältig aus und erhält so das Mark dunkel, fast schwarz gefärbt.

713. Goldchlorid. Frey (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. Suppl. 1897 p. 108) färbt die Markscheiden der Hautnerven, indem er ganz kleine Stücke menschlicher Haut in einer 2%igen Lösung von Ammoniumbichromat mindestens 2 Wochen lang im Eisschrank härtet, nach kurzem Waschen mit Wasser auf 1 Stunde in Goldlösung (1%ig mit 1% Salzsäure) und von da nach Abspülung auf 24 Stunden im Dunkeln in $^1/_{50}$%ige Chromsäure bringt. Die Stücke schneidet er ohne Einbettung mit dem Gefriermikrotom, lässt die 30—50 μ dicken Schnitte auf dem Objektträger antrocknen, wäscht sie gut mit einer starken Lösung von Natriumhyposulfit, trocknet sie nochmals und schliesst sie in Balsam ein. Das Gold liegt als feinste Körnchen in den Markscheiden (s. auch oben p. 233), sowie in der Wand der Fettzellen. — S. auch unten § 755 die Methode von Ziehen.

714. Toluidinblau. Harris (Philadelphia Med. Journ. 1898; Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd. 1899 p. 63) färbt Schnitte von Material, das für Weigerts Methode gechromt ist, in alkalischer Lösung (je 1% Toluidinblau und Borax in Wasser) und differenzirt sie mit gesättigter Lösung von Gerbsäure oder, um besonders die Axencylinder hervortreten zu lassen, mit 1%iger Lösung von Oxalsäure in Alkohol.

b) Färbung des Axencylinders (und des Myelins).

715. Jodpalladium. Paladino (Rend. Accad. Napoli Anno 29 1890 p. 14, Anno 31 1892 p. 227; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 237, 9. Bd. 1892 p. 238) bringt Stücke von Material aus Kaliumbichromat, Chromsäure oder Sublimat, höchstens 5—8 mm dick, auf 2 Tage in sehr viel $^1/_{10}$%ige Lösung von Chlorpalladium (oben § 74: auf jedes Stück 150—200 ccm), dann auf 24 Stunden in

eine 1%ige Lösung von Jodkalium, oder nach der zweiten Vorschrift in nur relativ wenig von einer 4%igen Lösung und auch nur auf 1—2 Stunden, damit sich das rasch entstehende Jodpalladium nicht wieder auflöse. Schliesslich entwässert er sie, bettet sie eventuell aus Chloroform in Paraffin ein und legt die Schnitte in Balsam.

Neuerdings (Boll. Accad. Med. Roma Anno 19 1893 p. 256; Arch. Ital. Biol. Tome 22 1894 p. 40) bringt Paladino die Objekte aus Müllers Gemisch oder dem Kaliumbichromat (2—4%) erst unter die Wasserleitung, dann allmählich in Alkohol von 96%, und „entmarkt" dann kleine Stücke davon, indem er sie im Brütofen auf je 1 Stunde in absol. Alkohol und Benzol und wieder in absol. Alkohol legt. Dann bleiben sie 24 Stunden lang in kaltem absol. Alkohol und und kommen nun in eine reichliche Menge des Chlorpalladiums (1—2%) auf eine Woche oder länger, dann auf 1—2 Tage in das Jodkalium (4%; nur wenig Lösung nehmen!), zum Schluss in Alkohol von 80%, von 96%, Aether, Celloidin (wird in Alkohol von 50% gehärtet), nicht aber in Paraffin. Die Schnitte werden in Chloroformbalsam eingeschlossen.

716. Vanadiumchlorid und Hämatoxylin. Wolters (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1891 p. 471) bettet das nach Kultschitzky gehärtete und mit Alkohol behandelte Material (oben § 59) in Celloidin oder Paraffin ein; die Schnitte behandelt er 24 Stunden lang mit einem Gemisch von 1 Theil 10%iger Lösung von Chlorvanadium und 4 Theilen 8%iger Lösung von Aluminiumacetat, wäscht sie 10 Minuten lang mit Wasser und färbt sie 24 Stunden in Kultschitzkys Lösung von Hämatoxylin (1 g auf 50 ccm einer 2%igen Essigsäure). Dann wäscht er sie in saurem 80%igem Alkohol (1/2% Salzsäure) so lange, bis sie hell blauroth werden, schafft die Säure durch Alkohol sorgfältig fort und führt die Schnitte durch Origanumöl in Balsam über. Bloss der Axencylinder ist gefärbt, das Myelin nur, wenn die Säure nicht ordentlich gewirkt hat.

717. Hämateïnthonerde und Säurefuchsin. Finotti (Arch. Path. Anat. 143. Bd. 1896 p. 167; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 236) gibt zwei Methoden zum Färben der Nervenfasern auf Schnitten an: 1) für die Axencylinder allein Hämateïnthonerde, dann 1/2—1%ige Lösung von Säurefuchsin (3 Minuten lang), Differenzirung in 75%igem Alkohol mit etwas Aetzkali; 2) für Axencylinder und Nervenmark starke Färbung in Hämatoxylin nach Delafield, dann einige Sekunden in konzentrirter Pikrinsäurelösung, darauf Säurefuchsin (1/2%), dann Alkohol mit Aetzkali. Ueber die 3. Methode von Finotti s. oben § 711.

718. Hämatoxylinkupfer. Scarpatetti (Neur. Centralbl. 16. Jahrg. 1897 p. 211) härtet Gehirn oder Rückenmark 3 Tage bis Monate lang in 5—10%igem

Formol, dann in 95%igem Alkohol, und bringt die Celloidinschnitte zuerst in Hämatoxylinlösung (1%), dann nach 5 Minuten in konzentr. Lösung von Kupferacetat, nach weiteren 5 Minuten in Weigerts Gemisch von 4 Theilen Borax, 5 Theilen rothem Blutlaugensalz und 200 Theilen Wasser, endlich in konzentr. Lösung von Lithiumkarbonat. Nur die Axencylinder sind gefärbt.

S. auch oben p. 367 (Bolton und Hill).

719. Galleïn. Aronson (Centralbl. Med. Wiss. 28. Jahrg. 1890 p. 577) legt die Schnitte von Material aus Erlitzkis Gemisch oder aus Müllers Gemisch (alsdann zunächst mit Kupferacetat zu behandeln) auf 12—24 Stunden (bei 37° C. nur auf 1—3 Stunden) in folgendes Gemisch: Galleïn-Paste (bei Grübler zu haben) 3—4 ccm, Alkohol 20, destill. Wasser 100 ccm. konzentr. Lösung von Soda 3 Tropfen. Dann differenzirt er sie nach Weigert oder Pal oder mit Chlorkalk (einige Tropfen der konzentr. wässerigen Lösung auf ein Schälchen voll Wasser), überträgt sie in eine konzentr. Lösung von Soda oder Lithiumkarbonat, bis sie roth werden, und bringt sie durch Origanumöl in Balsam. Nervenfasern leuchtend roth. Da das Galleïn als Beize für basische Farbstoffe dient (p. 593), so kann man die Fasern blau färben, wenn man sie nach der Differenzirung mit Kaliumhypermanganat 12—24 Stunden lang mit Methylenblau (mehrere Tropfen einer konzentr. alkoh. Lösung auf ein Uhrglas voll Wasser) färbt und dann mit Wasser, Alkohol und Origanumöl gründlich auswäscht.

720. Säurefuchsin. Die Methode von Weigert (Centralbl. Med. Wiss. 20. Bd. 1882 p. 753 u. 772), nämlich Ueberfärbung der Schnitte mit Säurefuchsin und Differenzirung mit Aetzkali in alkoholischer Lösung, hat nur noch historisches Interesse.

S. auch oben § 717 Finotti.

721. Methylenblau. Nach Sahli (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 3) wäscht man die Schnitte von Material, das in Kaliumbichromat für die Weigertsche Methode gut gehärtet ist, 5—10 Minuten lang mit Wasser, färbt sie mehrere Stunden in konzentr. wässeriger Lösung von Methylenblau, spült sie mit Wasser ab, färbt sie 5 Minuten lang in konzentr. wässeriger Lösung von Säurefuchsin, spült sie mit Alkohol ab und legt sie zur Differenzirung in viel Wasser: Axencylinder roth, Myelin blau. Spült man sie dagegen statt mit reinem Alkohol mit schwach alkalischem ($^1/_{10}$—1% Aetzkali) ab, differenzirt sie wieder in Wasser und führt sie durch Cedernöl in Balsam, der in Cedernöl gelöst ist, über, so ist das Myelin theils roth, theils blau.

Sahli (l. c. p. 50) färbt auch mit Methylenblau in alkalischer Lösung (3 Theile gesättigte Lösung, 2 Theile 5%iger Lösung von Borax und 5 Theile Wasser, 24 Stunden nach der Bereitung filtrirt), wäscht die Schnitte so lange mit Wasser oder Alkohol, bis sich die graue Substanz deutlich von der weissen abhebt, und bringt sie dann (wie oben) in Balsam. Die Präparate halten sich aber nicht lange.

Rossolimo & Murawjeff (Neur. Centralbl. 16. Jahrg. 1897 p. 722: Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1898 p. 511) färben Celloidinschnitte von Objekten, die in Formol fixirt worden sind, warm mit $^1/_2$%iger Lösung von Methylenblau,

bringen sie auf ganz kurze Zeit in „1 % spirituöse (90 %) Anilinlösung" und führen sie durch Cajeputöl in Balsam über.

722. Toluidinblau. Ueber die Methode von Harris s. oben § 714. — S. ferner § 710.

723. Gentianaviolett. Ohlmacher (*Journ. Exp. Med. Vol. 2 1897 p. 675) färbt aufgeklebte Schnitte 1 Minute lang mit Ehrlichs Gentianaviolett in Anilinwasser (§ 286), wäscht sie, färbt sie einige Sekunden lang in einem Gemisch von 200 Theilen halbgesättigter Lösung von Pikrinsäure und 1 Theil Säurefuchsin, wäscht sie erst mit Wasser, dann mit Alkohol (meist höchstens 1/2 Minute lang) und bringt sie durch Nelkenöl in Xylolbalsam.

724. Congoroth. Nissl (Münch. Med. Wochenschr. f. 1886 p. 528; Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 398) färbt die Schnitte 3 Tage lang mit einer Lösung von Congoroth (5 in 400 Wasser) und zieht sie dann mit saurem Alkohol (3 % Salpetersäure) aus.

725. Safranin. Adamkiewicz (Sitzungsb. Akad. Wien 89. Bd. 3. Abth. 1884 p. 245; Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 587) wäscht Schnitte von Material, das 1—3 Monate lang in Müllers Gemisch gehärtet worden ist, mit Wasser und etwas Salpetersäure, färbt sie mit einer konzentr. Lösung von Safranin, behandelt sie mit Alkohol und Nelkenöl, bis sie keine Farbe mehr abgeben, bringt sie in Wasser mit etwas Essigsäure zurück, färbt sie mit Methylenblau und bringt sie wieder in Nelkenöl: Myelin roth, Kerne violett.

Nikiforow (Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 338) ändert diese Methode dahin ab, dass er nach dem Färben mit Safranin die Schnitte mit Goldchlorid oder einem anderen Metallsalze imprägnirt. — Ciaglinski (Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 26) lässt auf das Safranin Anilinblau folgen; Ströbe (ibid. 10. Bd. 1893 p. 386) hingegen tingirt die Schnitte erst mit diesem Farbstoff (in gesättigter wässeriger Lösung), differenzirt sie nach Weigert mit Aetzkali in absol. Alkohol und färbt sie mit Safranin nach.

S. auch unten § 759 (Yamagiwa).

725a. Ueber die Färbung des Axencylinders mit Silbernitrat s. unten § 884.

29. Kapitel.

Methoden zur Untersuchung der Nervenzellen und ihrer Fortsätze.

a) Eigentliche Färbungen.

726. Karmin. Ammoniakkarmin ist zwar veraltet, aber für Uebersichtsbilder noch gut zu brauchen. Die Hauptsache ist, dass man sehr langsam in äusserst schwachen Lösungen färbt. Das Material aus Kaliumbichromat darf vorher nicht in Alkohol gewesen sein (oben p. 40). — Pikrokarmin wirkt ähnlich, hebt aber die nicht nervösen Elemente besser hervor. Material aus chromsauren Salzen färbt sich im Allgemeinen in beiden Karminen sehr langsam, wenn man jedoch (nach Obersteiner p. 16) die Schnitte in ein Uhrglas voll Färblösung legt und dieses auf einem Drahtnetz über kochendes Wasser bringt, so genügen schon einige Minuten. Merkel (Handb. Anat. Mensch. v. Henle 3. Bd. 2. Abth. 1871 p. VII) legt die Schnitte von dem in chromsauren Salzen fixirten Material auf 1—2 Minuten in eine Lösung von Chlorpalladium (1 : 300 bis 600), bis sie gelb werden, spült sie mit Wasser ab und färbt sie in starkem Ammoniakkarmin: Myelin gelb, Axencylinder, Nervenzellen und Neuroglia dunkelroth. — Boraxkarmin ist besonders gut, wenn man hinterher noch Indigkarmin oder Anilinblau nimmt. — Ueber Karmalaun s. oben p. 367 Hill. — Im Uebrigen s. Schmaus (*Münch. Med. Wochenschr. 38. Jahrg. 1891 p. 147; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 230: Urankarmin; Upson (*Neur. Centralbl. 7. Jahrg. 1888 p. 319; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 525); Freeborn (*Amer. Month. Micr. Journ. Vol. 9 1888 p. 231; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1889 p. 305: Karminsäure, nachher Eisenchlorid), sowie oben p. 239 die Methode von Gerlach.

727. Anilin Blue-Black. Sankey (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 16 1876 p. 95 u. 183), der es zuerst empfohlen hat, färbt die Schnitte in $^1/_2$ %iger alkoholischer oder in wässeriger Lösung. — Lewis (ibid. p. 74; *Human Brain p. 125) rühmt es sehr: er färbt die Schnitte 1 Stunde lang in einer $^1/_4$ %igen Lösung und wäscht nur die von der Kleinhirnrinde 20—30 Minuten lang mit Chloralhydrat (2%), die von Hirn oder Rückenmark aber nicht. — Vejas (*Arch. Psychiatr. 16. Bd. 1886 p. 200) färbt mit sehr schwacher Lösung (1—3000), dafür aber 18—24 Stunden lang. — Gierke (Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 379) hat in Deutschland keinen guten Farbstoff erhalten und findet auch das Auswaschen mit Chloralhydrat schädlich; ebenso Martinotti (ibid. 2. Bd. 1885 p. 478).

IKLGERSMA (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 39) ist mit dem Anilin Blue-black äusserst zufrieden, aber nur mit dem englischen. Er färbt mit einer Lösung von 1:100 die Schnitte $^1/_4$ Stunde, mit einer von 1:800 5 Stunden und mit einer von 1:2000 12 Stunden lang. Neuroglia und Bindegewebe werden nicht gefärbt. — SCHMAUS (*Münch. Med. Wochenschr. 38. Jahrg. 1891 p. 147; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 230) empfiehlt ebenfalls das englische Produkt (bei Grübler & Hollborn zu haben): in einer $^1/_4$%igen Lösung in 50%igem Alkohol mit ein wenig Pikrinsäure färbt er die Schnitte 1 Stunde lang und erhält so das Celloidin fast farblos, während es sich in der einfachen wässerigen Lösung stark färbt.

728. Pikronigrosin gibt nach MARTINOTTI (Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 478) sehr gute Resultate. Er färbt 2—3 Stunden oder Tage lang mit einer gesättigten Lösung von Nigrosin in gesättigter Lösung von Pikrinsäure und wäscht mit einem Gemisch von 1 Theil Ameisensäure und 2 Theilen Alkohol so lange aus, bis die graue und weisse Substanz sich schon dem blossen Auge deutlich von einander abheben.

729. Ehrlich-Biondisches Gemisch empfiehlt ROSIN (*Neur. Centralbl. 12. Jahrg. 1893 p. 1; Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 77). — Lindsay JOHNSON (in litt.) vermischt damit etwa $^1/_3$ Vol. einer 20%igen (gesättigten) Lösung von Nigrosin. — Ueber Kresylviolett s. oben § 341.

730. Naphthylaminbraun wird von KAISER (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 471) für Celloidinschnitte durch Rückenmark empfohlen: die Schnitte färbt er einige Stunden lang in einer Lösung von 1 Theil auf 100 Theile Alkohol und 200 Theile Wasser, wäscht sie mit Alkohol und bringt sie durch Origanumöl in Balsam.

731. Karmin und Methylenblau nach REHM (*Münch. Med. Wochenschr. 39. Jahrg. 1892 p. 217; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 389). Schnitte von Material aus Alkohol färbt man 5 Minuten lang in 1%igem Ammoniakkarmin, wäscht sie in Alkohol von 70% mit 1% Salpetersäure, dann in reinem Alkohol, färbt sie $^1/_2$ Minute lang in $^1/_{10}$%iger Lösung von Methylenblau und führt sie durch Origanumöl in Kolophonium über.

732. Methylenblau nach REHM (l. c.) zum Färben des Plasmas. Rehm modifizirt die Methode von Nissl (oben § 689) dahin, dass er die Schnitte von Material aus Alkohol $^1/_2$—1 Minute lang mit heisser $^1/_{10}$%iger Lösung von Methylenblau färbt, sie in Alkohol von 96% auswäscht und durch Origanumöl in Balsam oder Benzinkolophonium bringt. Nervenzellen dunkelblau, Bindegewebe heller, grünlich. Noch schärfer wird der Unterschied, wenn man nur $^1/_2$ Minute lang färbt, mit Alkohol von 90% wäscht und 15—30 Minuten lang mit einer $^1/_{10}$%igen Lösung von Fuchsin in 96%igem Alkohol nachfärbt, in Alkohol auswäscht, bis keine rothe Farbe mehr ausgezogen wird, und durch Nelkenöl in Balsam etc. bringt. Nervenzellen blauroth mit ungefärbten Kernen, die übrigen Kerne lebhaft roth. (Dieser Unterschied zeigt sich aber an embryo-

nalem Gewebe nicht.) Die Kerne des Bindegewebes und der Gefässe treten auch hervor, wenn man einige Minuten lang in 1 %iger Lösung von Eosin und ebenso lange in warmer $^{1}/_{10}$ %iger Lösung von Dahlia färbt; oder zuerst in Nigrosin (1 %) und dann $^{1}/_{2}$ Stunde in Fuchsin ($^{1}/_{10}$ %).

Ramón y Cajal (*Rev. Trimestr. Micr. Madrid Vol. 1 1896 p. 1) färbt die mit Alkohol von 96 % oder besser mit Sublimat fixirten Objekte in einem Gemisch gleicher Theile 1 %iger Lösungen von Methylenblau und von Fuchsin; er will damit bessere Resultate erzielen als nach der komplizirten Methode von Rehm.

733. Hämatoxylin und Phosphormolybdänsäure nach Mallory (Anat. Anzeiger 6. Jahrg. 1891 p. 375). Nach Schiefferdecker & Vobis (Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 341) färben sich Celloidinschnitte von Material aus Müllers Gemisch gut damit.

Sargent (Anat. Anzeiger 15. Bd. 1898 p. 214) benutzt es für das in Formol (10 %) fixirte Rückenmark von Fischen, das er aber zuvor (nach Kenyon, s. unten § 836) mit Kupfersulfat behandelt hat.

734. Congoroth. Alt (*Münch. Med. Wochenschr. 39. Jahrg. 1892 No. 4; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 81) färbt einige Stunden lang mit Congoroth in absolutem Alkohol und wäscht mit reinem Alkohol aus. Schiefferdecker empfiehlt in seinem Referate die Methode nicht. Squire hingegen (Methods p. 48), der eine 2 %ige Lösung in Wasser benutzt, rühmt sie sehr.

S. im Uebrigen die Methoden in Kapitel 27 u. 28, von denen manche auch hier anwendbar sind.

b) Imprägnationen.

735. Methylenblau für das Centralnervensystem. Meyer (Arch. Mikr. Anat. 46. Bd. 1895 p. 282) injizirt von einer 1 %igen Lösung subcutan mehrere Male in Intervallen von 1 bis mehreren Stunden verhältnissmässig grosse Mengen (z. B. einem jungen Kaninchen 2×20 ccm), tödtet das Thier und bringt die Stücke direkt in gut gekühltes Gemisch von Bethe (oben § 306); sie bleiben darin bis zum folgenden Tage. — Oder (ibid. 47. Bd. 1896 p. 735) er injizirt Lösungen von Methylenblau BX, die bei 37° C. gesättigt sind (enthalten 5—6 %). und führt die ganze Menge in 1—2 Stunden ein, z. B. einer erwachsenen Katze 150 ccm. — S. auch Krause & Philippson (Arch. Mikr. Anat. 57. Bd. 1901 p. 489).

Ramón y Cajal (Rev. Trimestr. Micr. Madrid Vol. 1 1896 p. 123; Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 92) färbt das Hirn von *Lepus cuniculus* mit Methylenblau durch „Propagation“ oder „Diffusion“, d. h. er streut auf Stücke von nur 2—3 mm Dicke in situ äusserst fein gepulvertes Methylenblau BB (oder bepinselt sie mit ganz konzentrirter Lösung), deckt die Schädelkapsel wieder darauf und nimmt die Scheiben erst nach $^{1}/_{2}$—$^{3}/_{4}$ Stunden heraus. Dann spült er sie in Normalsalzwasser rasch ab, fixirt sie mit Ammoniummolybdänat nach Bethe (ohne H_2O_2) 2—3 Stunden lang, wäscht sie einige Minuten lang und härtet sie in einem Gemisch von 1 %iger Platinchloridlösung (1 Theil), Formol (40) und Wasser (60) 3—4 Stunden lang. Hierdurch wird zugleich die Farbe ganz

unlöslich in Wasser, Glycerin etc. Weiterbehandlung kleinerer Objekte (Retina, Ganglien, Hirn von *Rana* etc.) mit Wasser, Lösung von Platinchlorid (1 : 300) in absolutem Alkohol, Xylol, Einbettung in Paraffin. Grössere Objekte werden nur mit einem Mantel von Paraffin umgeben und feucht geschnitten; die Schnitte werden mit Alkohol und Platinchlorid, dann mit reinem absol. Alkohol entwässert und durch Xylol oder Bergamottöl in Balsam gebracht.

Catois (C. R. Acad. Sc. Paris Tome 124 1897 p. 124) injizirt in die Leibeshöhle von Fischen eine konzentrirte Lösung von Methylenblau, nimmt nach $^1/_2$ Stunde das Gehirn heraus, schneidet es in Stücke, legt diese auf $^1/_2$ Stunde in dieselbe Lösung und fixirt die Präparate wie gewöhnlich.

S. auch die Methoden in Kapitel 15.

736. Der Methoden von Golgi gibt es zwei: die mit Sublimat (s. unten § 752) und die mit **Höllenstein.** Die letztere hat Golgi in drei Weisen ausprobirt, die als die langsame, die rasche und die gemischte Methode bekannt sind. Die rasche wird gegenwärtig am meisten zur Untersuchung des Verlaufes und Verhaltens der Axencylinder und der Plasmafortsätze in gehärteten Geweben benutzt und leistet hierin ähnliches wie für frisches Gewebe das Methylenblau.

Allgemeiner Charakter der Imprägnation. Die Präparate sehen durchaus nicht wie gefärbt aus und gewähren sogar einen ganz anderen Anblick als die Imprägnationen frischer Gewebe mit Höllenstein oder Goldchlorid. Auch sind sie nur partiell imprägnirt, d. h. von den Elementen des Gewebes, seien sie nun nervös oder nicht, ist immer nur eine gewisse Anzahl versilbert. Das ist aber durchaus kein Nachtheil, eher ein Vorzug der Methode, denn die wenigen gefärbten treten so lebhaft und auf so lange Strecken hervor, dass man sie zwischen den ungefärbt bleibenden (den Stützzellen etc.) auf weite Entfernung verfolgen kann. Dies leistet bisher keine andere Methode in solcher Vollkommenheit, dafür aber zeigt die Golgische keine histologischen Einzelheiten in den anderen Geweben des Präparates, und absolut keine cytologischen. Sie ist daher eine ganz spezielle Methode.

Die Axencylinder werden nur so weit imprägnirt, wie sie keine Markscheide haben; will man also die Fasern in Hirn und Rückenmark damit darstellen, so muss man als Objekte Embryonen oder neugeborene Thiere nehmen, wo die Markscheiden noch nicht ausgebildet sind.

Uebrigens imprägnirt sich nicht nur das Nervengewebe, vielmehr hat man die Methode erfolgreich auch zum Studium der Gallencapillaren, Drüsengänge, elastischen Fasern etc. benutzt. Deswegen aber, und da sie auch ganz launenhaft immer nur wenige Elemente im Präparate imprägnirt, muss man bei der Deutung der

Bilder sehr vorsichtig sein. Oben § 363 ist vom Gold gesagt worden, dass „auch die besten Vergoldungen nur so weit Glauben verdienen, wie sie etwas zeigen, dagegen gar keinen Beweis dafür liefern, dass Dinge, die sie nicht zeigen, auch nicht existiren". Diese Warnung gilt wenigstens ebenso sehr hier. Dazu kommt noch als weitere Quelle der Irrthümer der Umstand, dass die Methode häufig Niederschläge von Silberbichromat liefert, die den Dendriten und anderen Feinheiten an den Nerven ganz ähnlich sehen (s. hierüber auch Friedländer in: Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 168, und § 740).

Die Methode eignet sich auch für manche Wirbellose.

In ihren Einzelheiten ist die Methode durch andere Forscher stark modifizirt worden; die bedeutendste Aenderung ist die doppelte Imprägnation nach Ramón y Cajal (§ 741). Golgi selbst hat sich ausführlich über seine Methode in den Arch. Ital. Biol. Tome 7 1886 p. 15 ff. ausgesprochen.

737. Golgis **langsame** Methode mit Höllenstein (l. c. p. 17). Man härtet die Objekte entweder in Kaliumbichromat oder in Müllers, weniger gut in Erlickis Gemisch, und zwar gewöhnlich in Kaliumbichromat von 2 %, das man allmählich unter häufigem Wechsel der Lösung bis auf 5 % verstärkt. Am besten nimmt man ganz frisches Gewebe (24—48 Stunden nach dem Tode ist es auch noch brauchbar), aber die Stücke dürfen höchstens $1^1/_2$ ccm gross sein. Nur schwer trifft man genau die richtige Härte; präzise Vorschriften lassen sich hierüber nicht geben. Im Sommer kann man schon mit 15—20 Tagen auskommen, und das Material bleibt auch bis zu 50 Tagen verwendbar; bei kaltem Wetter dauert es meist 1 Monat, und es bleibt gut bis zu 4 Monaten. Man muss es eben ausprobiren, indem man im Winter alle 8—10 Tage, im Sommer häufiger, ein Stück in das Silberbad bringt und zusieht, ob die Reaktion eintritt. Gut ist auch die Injektion des Härtmittels ($2^1/_2$ %iger Lösung von Kaliumbichromat) in die Organe. Die Härtung wird durch konstantes Erwärmen auf 20—25° C. beschleunigt, aber man riskirt leicht ein Uebermaass von Härte, auch sind die weiteren Resultate nicht so günstig.

Zur Imprägnation bringt man die Stücke aus dem Härtgemisch in ein Bad von Höllenstein (gewöhnlich eine $^3/_4$ %ige Lösung, jedoch scheint eine $^1/_2$ %ige besser für nicht ganz harte, und eine 1 %ige besser für etwas überhärtete Objekte zu sein). Jedenfalls muss man relativ viel Lösung nehmen. Da nun beim Einlegen in das Bad sich

sofort viel Silberbichromat ausscheidet, sodass es schwächer wird, so wäscht man die Objekte am besten vorher in einer schwächeren Lösung ab, bis auch beim Einlegen in ein neues Quantum kein Niederschlag mehr entsteht; hierzu können die gebrauchten Bäder dienen. Um das definitive Bad braucht man sich dann weiter nicht zu kümmern, es sei denn, dass es nach 6—10 Stunden doch etwas gelb würde, und dann muss es ersetzt werden. Im Dunkeln braucht man es nicht zu halten, wohl aber stellt man es im Winter vortheilhaft an einen warmen Platz. Die Reaktion tritt nach 24—30, nur ausnahmsweise nach 48 Stunden ein, jedoch kann man die Objekte ohne Schaden Monate lang im Bade lassen.

Sobald ein Versuch ergibt, dass die Imprägnation gut gelungen ist, bringt man die Objekte in Alkohol und wechselt diesen so oft, bis er ganz klar bleibt, auch wenn sie schon 2—3 Tage in ihm sind. Denn für die gute Erhaltung muss der Ueberschuss an Silber sorgfältig entfernt werden. Nun macht man die Schnitte (§ 746), wäscht sie 3 oder 4 mal mit Alkohol, bringt sie auf einige Minuten in Kreosot, dann auf 10—15 Minuten in Terpentinöl, endlich in Balsam, besser aber in Dammar, und jedenfalls ohne Deckglas. So halten sie sich, namentlich im Dunkeln, sehr gut, während sie unter dem Deckglas verderben (unten § 747). Golgi hat viele Präparate 9 Jahre lang unverändert gehabt.

Die Reihenfolge, in der sich die Elemente imprägniren, ist: erst die Axencylinder, dann die Ganglienzellen, zuletzt die Neurogliazellen.

Hunter (Journ. Anat. Phys. London Vol. 32 1897 p. 109) härtet ein ganzes Hirn- oder Rückenmark $1\frac{1}{2}$—6 Monate lang in Müllers Gemisch, schneidet dann kleine Stücke davon ab, wäscht diese mit Wasser, bringt sie (bei Blutwärme) auf 24 Stunden in eine 1 oder 2 mal zu wechselnde $\frac{3}{4}$%ige Lösung von Höllenstein, bettet sie in Celloidin und schneidet sie wie gewöhnlich.

738. Golgis **rasche** Methode mit Höllenstein (l. c. p. 33). Man legt kleine Stücke von ganz frischem Gewebe in ein Gemisch aus 4 Theilen 2—$2\frac{1}{2}$%iger Lösung von Kaliumbichromat und 1 Theil 1%iger Osmiumsäure. Hierin werden sie schon am 2. oder 3. Tage zur Imprägnation reif, noch besser in den nächsten Tagen, aber diese günstige Eigenschaft ist am 10.—12. Tage meist wieder ganz verloren. Man imprägnirt die Stücke, schneidet sie und legt die Schnitte ein wie bei der vorigen Methode. Jedoch darf das imprägnirte Material zwar im Höllenstein beliebig lange, im Alkohol aber höchstens 2 Tage bleiben. Im Ganzen ist diese Methode nicht nur wegen ihrer Schnelligkeit,

sondern auch wegen der Sicherheit und Zartheit der Resultate allgemein sehr beliebt, während Golgi selbst die gemischte (§ 739) vorzieht.

Golgi (Cinquantenaire Soc. Biol. Paris Livre jubil. 1899 p. 514) setzt das Gemisch jetzt aus 2 Theilen 3 %igem Bichromat und 1 Theil 1 %iger Osmiumsäure zusammen.

Für Fische nimmt Monti (Ricerche innervaz. organi trofici Cranioti infer. Torino 1898 p. 33 u. 38) ein Gemisch von 4 Th. 3 %igem Kaliumbichromat und 1 Th. 1/2 %iger Osmiumsäure. Man erneuert es, wenn es nicht mehr nach letzterer riecht. Am besten bringt man die Objekte in das Silberbad am 4. oder 5. Tage und lässt sie nicht lange darin. Alle Operationen sind im Dunkeln vorzunehmen.

739. Golgis **gemischte** Methode mit Höllenstein (l. c. p. 34). Die Stücke frischen Gewebes legt man auf 2—25 oder 30 Tage in die gebräuchliche Lösung von Kaliumbichromat, bringt aber alle 2—4 Tage einige in das Gemisch mit der Osmiumsäure nach der raschen Methode, härtet sie darin 3 oder 4 bis 8 oder 10 Tage lang und behandelt sie im Uebrigen wie nach der raschen Methode. Golgi zieht diese Methode vor: 1. weil man die Reaktion in ganz verschiedener Stärke verfolgen kann, falls man nur genug Stücke eingelegt hatte; 2. weil man etwa 25 Tage lang immer Stücke vorräthig hat, die sich versilbern lassen, und doch auch den Prozess jederzeit dadurch beschleunigen kann, dass man sie in die Osmiumsäure bringt; 3. weil die Resultate noch besser ausfallen.

740. Theoretisches über die Methode mit Höllenstein. Wahrscheinlich beruht die Methode darauf, dass sich in den Geweben ein Niederschlag von Silberbichromat bildet, der im auffallenden Lichte braun, im durchfallenden schwarz ist. Manche Anhänger der Methode, eifriger als Golgi selbst, behaupten mit Bestimmtheit, das Metall imprägnire die Zellen und Fortsätze selber. Indessen davon kann wohl nicht die Rede sein, vielmehr bildet es, wie besonders Rossbach & Sehrwald (Centralbl. Med. Wiss. 26. Jahrg. 1888 p. 469 u. 498) und Kronthal (Arch. Path. Anat. 130. Bd. 1892 p. 233) nachgewiesen haben, einen Ueberzug über diese Elemente, der so zu Stande kommt, dass die entweder normalen oder sich durch Schrumpfung bildenden pericellulären Räume vom Silbersalze angefüllt werden. Hält man sich aber dieses Resultat vor Augen, so kann man nicht im Zweifel darüber sein, was die Methode selbst im günstigsten Falle zu bieten vermag. S. auch oben § 736 und Carazzi, Manuale p. 243.

Kronthal (l. c. p. 239) hält es für möglich, aber nicht beweisbar, dass auch die Gebilde in den gefärbten Räumen gefärbt seien, falls letztere überhaupt

immer Zellen oder Fasern enthalten. Er gibt p. 247 eine Methode zur Entfärbung der imprägnirten Gebilde und zur Nachfärbung mit Methylenblau an. — Auch ZIMMERMANN (Arch. Mikr. Anat. 52. Bd. 1898 p. 555) findet durch Nachfärbung, dass ein Theil des Niederschlages auf der Zelle liegt.

WEIGERT (Anat. Hefte 2. Abth. 5. Bd. 1896 p. 7) bespricht die Methoden von Golgi ausführlich, drückt sich aber unter Anderem sehr reservirt dahin aus, dass der Niederschlag jedenfalls irgend ein Silberchromat sei. Die Osmiumsäure sei für die Reaktion nicht prinzipiell nöthig; s. aber unten § 743 (KOLOSSOW).

Eine ausgedehnte Untersuchung über die Methode von Golgi hat HILL angestellt (The Chrome-Silver Method [etc.] in: Brain Pt. 73 1896 p. 1). Er injizirt die Lösung von Kaliumbichromat (ohne Osmiumsäure) dem Thiere sofort nach dem Tode, bevor noch das Herz stillsteht, durch die Aorta, setzt ihr aber, um die Kontraktion der Gefässe zu verhindern, 1% Milchsäure zu. Dass das Härtgemisch (und später die Silberlösung) rasch eindringe, scheint ihm für das Gelingen der Reaktion von grosser Wichtigkeit zu sein. Am leichtesten permeabel ist das Centralnervensystem von *Erinaceus*, kann daher in toto behandelt werden. Auf die Länge der Härtung kommt nicht viel an; Wärme beschleunigt die Reaktion, ändert sie aber qualitativ nicht; ob man im Licht oder im Dunkeln operirt, ist gleichgültig; das Einbetten in Celloidin mag ruhig mehrere Tage dauern, und man erhält dann sogar bessere Schnitte, als wenn man rasch verfährt. (Man gebe zum Aether-Alkohol, in dem das Objekt liegt, von Zeit zu Zeit trocknes Celloidin, sodass erst nach 4 Tagen die Lösung dick genug ist.) Die Osmiumsäure ist unnöthig. Statt des Höllensteins empfiehlt sich eine etwa $^3/_4$%ige Lösung von Silbernitrit, der man $^1/_{1000}$ Ameisensäure zusetzt. Die Färbung nach Golgi beruht nicht auf Bilduug von Silberchromat, sondern eines „reduced salt (sub-salt) of silver“. Auch Gehirne, deren Gefässe lange mit Salzwasser oder Milchsäure ausgewaschen sind, färben sich noch gut. Wahrscheinlich reagiren nicht die leitenden Fibrillen, sondern das flüssige „Neuroplasma“, worin sie liegen, auf die Silberlösung.

Nach AZOULAY (C. R. Soc. Biol. Paris (10) Tome 1 1894 p. 839), der die Vorgänge bei der Golgischen Methode an Schnitten unter dem Mikroskop verfolgt hat, handelt es sich dabei nur um eine „cristallisation ténue de chromate d'argent dans les éléments“.

DOGIEL (Anat. Anzeiger 10. Bd. 1895 p. 555) injizirt die Gefässe oder Drüsengänge vor der Behandlung nach Golgi mit irgend einer Farbmasse, um sie von den Nerven sicher unterscheiden zu können.

Es ist noch nicht festgestellt, warum die Präparate sich unter dem Deckglase nicht halten. S. auch § 747.

741. Doppelte Imprägnation nach RAMÓN Y CAJAL. In einer spanischen Arbeit über die sympathischen Ganglien (s. Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 241) beschreibt Ramón seine „doppelte oder intensive“ Methode. Er härtet Stücke der embryonalen Wirbelsäule von *Gallus* 3 Tage lang im Gemisch von Osmiumsäure und Kaliumbichromat (§ 738), legt sie auf 36 Stunden in die $^1/_2$—$^3/_4$%ige Lösung von

Höllenstein, bringt sie wieder auf 36—48 Stunden in jenes Gemisch zurück (oder in eins, das nur 1 Theil Osmiumsäure auf 10 Theile Bichromat enthält), wäscht sie rasch mit Wasser ab und bringt sie nochmals auf 36—48 Stunden in den Höllenstein. Hat man sie zuerst im Osmium-Bichromat zu lange (4 Tage) oder zu kurz (1 Tag) gelassen, so gelingt die zweite Behandlung damit nicht, und dann muss man den Prozess zum dritten Male vornehmen.

742. Ueberhärtete Gewebe, die 3—4 Wochen lang im Gemisch von Osmiumsäure und Kaliumbichromat gewesen sind, imprägniren sich nicht mehr mit Silber (oben p. 378). Man kann sie jedoch nach Golgi (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 11. Bd. 1894 p. 328; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 389) wieder gut machen, indem man sie mit einer halb gesättigten Lösung von Kupferacetat so lange wäscht, bis sie keinen Niederschlag mehr geben, und dann auf 5—6 Tage in das obige Gemisch zurück bringt. Solches Material gibt nach der Imprägnation äusserst lehrreiche Schnitte, die sich auch in eingedicktem Cedernöl unter dem Deckglase halten.

Diese sogenannte Verjüngung nimmt Golgi (Cinquantenaire Soc. Biol. Paris Livre jubil. 1899 p. 514) gegenwärtig so vor, dass er die Objekte auf 8 Stunden bis 10 Tage und länger in ein Gemisch gleicher Theile einer 2—3%igen Lösung von Kaliumbichromat und einer 4—5%igen von Kupfersulfat bringt, und von da direkt in das Silberbad.

Monti (l. c. in § 738 p. 35) verwendet für das Nervensystem von Fischen zuerst eine halbgesättigte Lösung von Kupferacetat oder Kupfersulfat 2—3 Tage lang, dann 1—14 Tage lang das Bichromat oder Osmiumbichromat. Die Präparate sollen auf diese Weise besonders fein werden.

743. Leichte Abänderungen der Methode mit Höllenstein. Kallius (Anat. Hefte 1. Abth. 3. Bd. 1894 p. 531) hat oft mit Vortheil statt des Kaliumbichromats das Ammonium- oder Natriumsalz verwandt und alle Operationen im Dunkeln vorgenommen, dabei auch nur selten zur doppelten Imprägnation greifen müssen. — Ueber die Chromate des Calciums, Magnesiums, Zinks, Kupfers etc. in ihrer Anwendung auf Golgis Methode s. Sala (Monitore Z. Ital. Anno 9 1898 p. 63).

Gudden (Neur. Centralbl. 20. Jahrg. 1901 p. 152) verwendet Silberlaktat („Aktol"), weil es tiefer eindringe als Höllenstein.

Smirnow (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 10. Bd. 1893 p. 244; Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 254) härtet zum Studium der Nervenenden in der Menschenhand die Stücke in Altmanns Gemisch (gleichen Theilen von 5%igem Kaliumbichromat und 2%iger Osmiumsäure) 5—10 Tage lang und imprägnirt sie mit 1%igem Höllenstein. — Für die Nervenenden in der Haut von *Lumbricus* (Anat. Anzeiger 9. Jahrg. 1894 p. 571) härtet er 5—28 Tage lang in einem Gemisch gleicher Theile von 5%igem Bichromat und 1%iger Osmiumsäure. —

Für das Kleinhirn von *Canis* legt er (Arch. Mikr. Anat. 52. Bd. 1898 p. 202) die Objekte, bevor sie in das Silberbad kommen, in eine „schwache wässerige Lösung von NO_2OAg".

Kolossow (Arch. Mikr. Anat. 49. Bd. 1897 p. 592) härtet die Objekte 1—7 Tage in einer 3—5%igen Lösung von Kaliumbichromat in 1/4%iger Osmiumsäure, wäscht sie mit destill. Wasser, trocknet sie mit Löschpapier ab und legt sie auf 2—3 Tage in eine 2—3%ige Lösung von Höllenstein in 1/4 bis 1/2%iger Osmiumsäure. Die Imprägnation soll viel vollständiger und reiner sein als sonst, und dies soll auf der Gegenwart der Osmiumsäure beruhen. — S. auch Juschtschenko in: Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 82.

Ueber das Verfahren von Nabias s. unten § 822.

Böhm (s. Kupffer in: Sitzungsb. Ges. Morph. Phys. München 5. Bd. 1889 p. 85) und Oppel (Anat. Anzeiger 5. Jahrg. 1890 p. 144; 6. Jahrg. 1891 p. 168) nehmen für die Leber (aber nicht für die Nerven darin) im langsamen Verfahren statt des Kaliumbichromats der Eine eine 1/2%ige Lösung von Chromsäure (48 Stunden lang), der Andere Kaliummonochromat (s. unten § 811).

Berkley (Anat. Anzeiger 8. Jahrg. 1893 p. 772) bringt von der Leber Stücke von höchstens 1 1/2 mm Dicke noch warm in eine warme halb gesättigte wässerige Lösung von Pikrinsäure und von da nach 15—30 Minuten auf wenigstens 48 Stunden bei Abschluss von Licht und einer Temperatur von wenigstens 25° C. in ein Gemisch von 16 Theilen 2%iger Osmiumsäure und 100 Th. gesättigter Lösung von Kaliumbichromat, das vorher mehrere Tage der Sonne ausgesetzt gewesen ist. Zuletzt behandelt er sie in der gebräuchlichen Weise mit Höllenstein (Lösung von 1/4 und 3/4%) wenigstens 5 Tage lang, bettet sie in Celloidin ein etc.

Berkley (*J. Hopkins Hosp. Rep. Baltimore Vol. 6 1897; Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd. 1899 p. 94) setzt zum Silberbade auf 60 ccm 2 Tropfen der 10%igen Lösung von Phosphormolybdänsäure. Die Objekte sind zuerst in Müllers Gemisch, dann in Osmiumbichromat gehärtet worden.

Vassale & Donaggio (Monitore Z. Ital. Anno 6 1895 p. 82) bringen Stücke von höchstens 1 cm Durchmesser auf 15—20 Tage in ein Gemisch von 5 Theilen Aldehyd und 100 Theilen 3—4%iger Lösung von Kaliumbichromat. (Nach einigen Tagen, wenn die Flüssigkeit dunkler wird, muss man sie wechseln.) Die weitere Behandlung nach Golgi.

Golgi (Cinquantenaire Soc. Biol. Paris Livre jubil. 1899 p. 514; Verh. Anat. Ges. 14. Vers. 1900 p. 174) legt zur Darstellung der Netze in den Ganglienzellen die Objekte in das Gemisch von Veratti, nämlich von je 2 Theilen einer 5%igen Lösung von Kaliumbichromat und einer 1/10%igen von Platinchlorid und 1—2 Theilen einer 1%igen Osmiumsäure. Weiterbehandlung wie gewöhnlich.

744. Gemische mit Formaldehyd. Strong (Anat. Anzeiger 10. Jahrg. 1895 p. 494) setzt zur 3 1/2- bis 5%igen Lösung von Kaliumbichromat 2 1/2—5% „Formalin" und vermeidet so die Ueberhärtung. — Aehnlich

Durig (ibid. p. 659): er härtet 3 Tage lang in einer 3%igen Lösung von Kaliumbichromat, die 4—6% Formaldehyd enthält, und imprägnirt dann doppelt nach Ramón y Cajal. — Fish (Trans. Amer. Micr. Soc. Vol. 17 1896 p. 319) härtet 3 Tage lang in 2 Theilen Formalin und 100 Theilen einer 3%igen Lösung von Kaliumbichromat (nachher 3 Tage in $^3/_4$%igem Höllenstein) oder noch besser in 100 Theilen von Müllers Gemisch, 2 Theilen 10%igem Formalin und 1 Theil 1%iger Osmiumsäure. Diese Gemische macht man am besten direkt vor dem Gebrauche und stellt sie ins Dunkle. — Kopsch (Anat. Anzeiger 11. Bd. 1896 p. 727) mischt kurz vor dem Gebrauche 40 ccm einer $3^1/_2$%igen Lösung von Kaliumbichromat mit 10 ccm Formol, legt kleine Stücke Gewebe, aber im Ganzen nur bis zu 2 ccm Substanz, hinein, schüttelt häufig um und bringt die Objekte nach 24 Stunden in die reine Lösung von Kaliumbichromat, wo sie nur 1 Tag (Gallen- und Sekretcapillaren, Netzhaut) oder 3—6 Tage (Netzhaut, Hirn etc.) bleiben und dann in die Silberlösung ($^3/_4$%ig) kommen. Die Blutgefässe imprägniren sich oft so stark, dass sie im mikroskopischen Bilde stören. Auch 24—48 Stunden altes Material lässt sich noch gut verwenden.

Duboscq (Arch. Z. Expér. (3) Tome 6 1899 p. 483) verwendet für Chilopoden ein vorher auf 52° C. erwärmtes und filtrirtes Gemisch von 3 Th. 5%iger Lösung von Kaliumbichromat und 1 Th. 20%igem Formol bei 40° C.; auch das Silberbad muss diese Temperatur haben. — S. auch Schreiber (Anat. Anzeiger 14. Bd. 1898 p. 275).

Reinen Formaldehyd nimmt zum Fixiren Gerota (*Internation. Monatschr. Anat. Phys. 13. Bd. 1896 p. 108; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 314): 5—10%iges Formol 1 Woche lang, dann 4%iges Bichromat 3—5 Tage lang. — Bolton (Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1899 p. 367) legt das Hirn von *Felis* auf 5 Wochen bis 5 Monate in 5%iges Formol, behandelt kleine Stücke davon höchstens 5 Tage lang mit 1%iger Lösung von Ammoniumbichromat und bringt sie dann in das Silberbad.

745. Gelatine nach Sehrwald (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1890 p. 456). Da sich beim Golgischen Verfahren auf den Objekten häufig starke Niederschläge bilden und die Klarheit der Bilder beeinträchtigen, so umkleidet Sehrwald jene vorher mit Gelatine. Er giesst nämlich eine schwach erwärmte 10%ige Lösung von Gelatine in ein Papierkästchen, bettet die Objekte hinein und versenkt sie damit in das Silberbad. Nach der Versilberung wäscht er die Gelatine mit warmer gesättigter Lösung von Silberchromat ab. Mit der Methode von

MARTINOTTI (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 7. Bd. 1890 p. 69), die Objekte einfach in Filtrirpapier einzuwickeln, ist Sehrwald nicht einverstanden.

746. Schneiden. Nach SALA (Zeit. Wiss. Z. 52. Bd. 1891 p. 23) ist die Methode von Greppin (§ 749) geradezu schädlich. Auch Sehrwalds Methode zum Einbetten in Paraffin, um dünne Schnitte zu bekommen, taugt nicht. Denn das Hauptverdienst der Methode von Golgi besteht ja darin, dass sie die Fortsätze weithin zu verfolgen erlaubt, was doch bei sehr dünnen Schnitten nicht angeht. Man wäscht daher die Objekte, wenn sie aus dem Höllenstein kommen, am besten mit Wasser aus, klebt sie mit Gummi arabicum auf einen Kork, härtet das Gummi in Alkohol einige Stunden lang und schneidet ohne besondere Einbettung mit dem Mikrotom. — S. auch § 748 u. 749.

747. Einschliessen der Schnitte. S. hierüber die Methode von Golgi (oben p. 379) und § 748—750.

RAMÓN Y CAJAL (s. Carazzi, Manuale p. 249) legt die Schnitte auf höchstens 1 Stunde in Alkohol von 95%, dann in Nelkenöl auf höchstens 1/2 Stunde und von da auf den Objektträger, wo er sie mit Filtrirpapier und Xylol vom Oel befreit und in dünnen Xyloldammar, der allmählich in mehreren Schichten aufgetragen wird, einschliesst.

Aus den Mittheilungen von SEHRWALD (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1890 p. 443), SAMASSA (ibid. 7. Bd. 1890 p. 26) und FICK (ibid. 8. Bd. 1891 p. 168) über die Konservirung der Präparate geht für die Praxis so viel hervor, dass man entweder nach der ursprünglichen Vorschrift von Golgi kein Deckglas auflegen darf oder erst den Balsam (mit den Schnitten darin) durch sorgfältiges Erwärmen ganz wasserfrei machen muss, ehe man es auflegt. — Die letztere Methode (Fick) empfiehlt auch HUBER (Anat. Anzeiger 7. Jahrg. 1892 p. 587).

748. Vergoldung der Schnitte. OBREGIA (Arch. Path. Anat. 122. Bd. 1890 p. 387; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 97) schneidet das Material entweder uneingebettet oder in Celloidin oder Paraffin, wobei man aber Alkohol unter 94—95% nicht anwenden darf. Dann bringt er die Schnitte aus absol. Alkohol in ein Gemisch von 10 ccm absolutem Alkohol mit 8—10 Tropfen einer 1%igen Lösung von Goldchlorid, die man 1/2 Stunde vorher anfertigt und bis dahin im diffusen Licht lässt, aber mit den Schnitten ins Dunkle stellt. Die Schnitte bleiben je nach der Dicke 15—30 Minuten darin, werden rasch in 50%igem Alkohol und in Wasser gewaschen, auf 5—10 Minuten in eine 10%ige Lösung von Natriumhyposulfit gelegt, gut ausgewaschen und entweder

sofort in Balsam gebracht (mit Deckglas!) oder vorher mit Karmin etc. gefärbt. Diese Methode eignet sich auch für Material, das mit Sublimat nach Golgi (unten § 752) behandelt worden ist.

Ramón y Cajal (La Cellule Tome 7 1891 p. 125; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 239) ist weder mit dem Goldchlorid von Obregia noch mit der Bromirung nach Greppin (§ 749) zufrieden, da diese Methoden zwar die Präparate stabiler, aber das feinere Verhalten der Fasern undeutlicher machen.

749. Bromirung der Schnitte. Greppin (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1889 Suppl. p. 55; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 66) findet, dass Bromwasserstoffsäure, wie Neumann vorschlägt, die Präparate nach der langsamen Methode von Golgi gegen das Deckglas unempfindlich macht. Nach dem Versilbern schneidet er mit dem Gefriermikrotom, behandelt die Schnitte 30—40 Sekunden lang mit 10%iger Bromwasserstoffsäure, wäscht sie tüchtig mit Wasser und bringt sie in Balsam. Wenn man sie noch im Nelkenöl 10—15 Minuten lang in die Sonne legt, so werden sie violett und zeigen die Einzelheiten schärfer. Mitunter behandelt man sie auch zweckmässig nach der 10%igen Säure 20 bis 30 Sekunden lang mit einer 40%igen. Auch vertragen sie die Färbung mit Hämatoxylin nach Pal. — S. aber § 748 (Ramón).

750. Chlorirung oder Schwefelung der Schnitte. Zimmermann (Arch. Mikr. Anat. 52. Bd. 1898 p. 554) führt das Silbersalz in den Präparaten entweder in Chlorsilber oder in Schwefelsilber über, indem er die Schnitte entweder 10—15 Minuten lang mit Chlornatrium (Normalsalzwasser 1 Theil, 96%iger Alkohol 2 Theile) behandelt und sie dann auf weissem Grunde unter Alkohol dem Lichte etwa $^1/_2$ Tag lang aussetzt; oder indem er $^1/_2$—1 Stunde lang auf sie Schwefelammon (einige Tropfen in 100 ccm absol. Alkohol) wirken lässt. In beiden Fällen kann man mit Thionin (oder Safranin) die Kerne etc. nachfärben.

751. Reduktion des Silbers nach Kallius (Anat. Hefte 1. Abth. 2. Bd. 1892 p. 271; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 477). 1 g Hydrochinon, 8 g Natriumsulfit und 15 g Kaliumkarbonat werden in 50 g destillirtem Wasser gelöst; von dieser Lösung verdünnt man 10 ccm mit 115 ccm Wasser, setzt ferner 40—60 ccm absoluten Alkohol hinzu und legt die Schnitte einige Minuten lang hinein, sodass sie dunkelgrau bis schwarz werden. Dann bringt man sie auf 10—15 Minuten in 70%igen Alkohol, auf 5 Minuten in eine etwa 20%ige Lösung von Natriumhyposulfit, endlich auf wenigstens einen Tag in sehr viel destillirtes Wasser. Alsdann durch Alkohol etc. in Balsam; auch kann man sie vorher mit Karmin etc. färben.

752. Golgis Methode mit Sublimat (*Arch. Sc. Med. Torino 1878 p. 3; Arch. Ital. Biol. Tome 7 1886 p. 35). Diese Methode, im Prinzipe gleich der mit Höllenstein, beruht auf dem Härten mit Kaliumbichromat und dem Imprägniren mit Quecksilber. Zum Härten nimmt man entweder Müllers Gemisch oder eine allmählich stärkere Lösung von

Kaliumbichromat (1—2½%), und zwar für die Stücke von höchstens 1—2 ccm Grösse relativ viel, wechselt sie auch häufig, damit sie klar bleibt. (Man kann auch grosse Stücke, sogar ganze Grosshirne, nehmen, muss dann aber die Flüssigkeit mehrere Male einspritzen, damit sie so rasch wie möglich ins Innere dringe.) Zum Härten genügen schon 6—8 Tage, besser sind 15—20, am besten aber 20—30, obwohl auch mehrere Monate nicht schaden.

Nach der Härtung imprägnirt man die Objekte mit einer ½%igen Lösung von Sublimat wenigstens 8—10 Tage lang (die Grosshirne 2 Monate und länger); man wechselt die Flüssigkeit Anfangs jeden Tag, später so oft, wie sie noch gelb wird. Zuletzt sind die Objekte ganz entfärbt und sehen wie frisch aus. Man kann sie im Sublimat beliebig lange lassen. (Für das Studium des diffusen Nervennetzes im Centralnervensystem thut man gut daran, sie in 1%igem Sublimat sehr lange, mitunter sogar 2 Jahre lang, liegen zu lassen; Golgi in: Arch. Ital. Biol. Tome 15 1891 p. 461; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 388).

Die Reaktion beginnt etwa dann, wenn die Objekte beinahe entfärbt sind; von da ab kann man alle Tage Schnitte machen und nach Belieben einschliessen. Zuvor jedoch muss man sie tüchtig mit Wasser waschen, damit keine schwarzen Niederschläge auftreten, kann sie nachher auch einige Minuten lang in ein photographisches Goldbad legen und mit irgend einer sauren Karminlösung färben. Zum Einschluss scheint Glycerin besser zu sein als Balsam.

Das Resultat ist keine echte Färbung, sondern eine „anscheinend schwarze Reaktion“, d. h. die Gewebe sind im durchfallenden Lichte schwarz, im auffallenden weiss; Golgi meint, es bilde sich ein Präzipitat und mache die Gewebe opak. Die Reaktion trifft 1) die Ganglienzellen mit all ihren Fortsätzen; dabei treten auch die Kerne hervor, die mit Höllenstein nicht sichtbar werden; 2) die Bindegewebzellen, jedoch lange nicht so vollständig und scharf wie mit Höllenstein; 3) die Blutgefässe, besonders ihre Muskelzellen. Gute Resultate giebt die Methode übrigens nur an der Rinde der Hirnwindungen, kaum welche am Rückenmark und sehr dürftige am Kleinhirn. Im Ganzen zeigt sie zwar nicht mehr als die mit Höllenstein, ist ihr aber darin überlegen, dass sie stets ganz sicher arbeitet, dass die Präparate ohne Weiteres haltbar sind, und dass man sogar ganze Hemisphären danach behandeln kann.

S. auch FLATAU in: Arch. Mikr. Anat. 45. Bd. 1895 p. 158. — BLOCHMANN (Biol. Centralbl. 15. Bd. 1895 p. 14) empfiehlt die Methode für das Nervensystem der Cestoden.

753. Abänderungen der Methode mit Sublimat. Cox (Arch. Mikr. Anat. 37. Bd. 1891 p. 16) härtet und imprägnirt zu gleicher Zeit: sein Gemisch besteht aus je 10 Theilen 5%iger Lösung von Kaliumbichromat und von Sublimat, 8 Theilen 5%iger Lösung von Kaliummonochromat und 15—20 Theilen Wasser. Es soll möglichst wenig sauer reagiren. Die Objekte legt man auf 2—3 Monate hinein. Die Schnitte müssen mit dem Gefriermikrotom gemacht werden, da sie den Alkohol nicht vertragen, kommen dann auf 2 Stunden in eine 5%ige Lösung von Natriumkarbonat, zuletzt in Wasser und durch absoluten Alkohol und ein Oel in Balsam, Dammar oder ein komplizirtes Gemisch von Harzen und Oelen. Unter dem Deckglase verderben sie aber. — CARAZZI (Manuale p. 255) rühmt aus eigener Erfahrung diese Methode.

TAL (*Gazz. Ospitali Milano 1886 No. 68) legt die nach Golgis Quecksilbermethode behandelten Schnitte in eine Lösung von Natriumsulfit. Sie werden dadurch viel dunkler. Auch kann man sie noch mit Magdalaroth färben. — Ueber die Kombination mit Weigerts Färbung s. PAL (*Wien. Med. Jahrb. 1886; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 92).

MAGINI (*Bull. Accad. Med. Roma 1886; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 87) härtet kleine Stücke wenigstens 2—3 Monate lang in Müllers Gemisch, wäscht sie mit Wasser gut aus und bringt sie auf 7—10 Tage in eine 1/10—1%ige Lösung von Chlorzink, die alle Tage erneuert wird. Die Schnitte werden rasch mit Alkohol gewaschen und durch Kreosot in Dammar gebracht: man soll an ihnen den feineren Bau der Ganglienzellen und ihrer Fortsätze besser erkennen, als nach der Methode von Golgi.

Ueber die Methode von FLECHSIG (mit japanischem Rothholz) s. Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1889 p. 537; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 71.

754. Imprägnation mit Bleisulfit. KRONTHAL (Neur. Centralbl. 18. Jahrg. 1899 p. 196; Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd. 1899 p. 235) stellt zunächst durch Einträufeln von Ameisensäure in eine Lösung von Bleiacetat kristallinisches Bleiformiat dar; in eine gesättigte wässerige Lösung davon, die mit der gleichen Menge 10%igen Formols [4% Formaldehyd] vermischt ist, legt er auf 5 Tage Stücke von frischem Gehirn oder Rückenmark ein, überträgt sie direkt in ein Gemisch gleicher Theile von Schwefelwasserstoffwasser und 10%igem Formol ebenfalls auf 5 Tage, wäscht sie, bettet sie in Celloidin ein und bringt die Schnitte durch Karbolxylol in Balsam. Das Schwefelblei

liegt als sehr feine Körnchen in den Zellen und den Fasern. Die Präparate sind haltbar. Auch ganze Hirne lassen sich so behandeln und in einem Gemisch gleicher Theile von Glycerin und 90 %igem Alkohol aufbewahren. — S. hierzu CORNING (Anat. Anzeiger 17. Bd. 1900 p. 109).

755. Sublimat und Goldchlorid. ZIEHEN (*Neur. Centralbl. 10. Jahrg. 1891 p. 65; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 385) legt kleine Stücke in eine reichliche Menge eines Gemisches von je 1 Theil Sublimat und Goldchlorid in 200 Theilen Wasser auf wenigstens 3 Wochen (besser noch bis zu 5 Monaten), bis sie metallisch rothbraun geworden sind. Dann kittet er sie auf Kork, schneidet sie ohne Einbettung, behandelt die Schnitte entweder mit dem auf das Vierfache verdünnten Lugolschen Gemisch (oben § 50) oder mit verdünnter Jodtinktur, bis sie ordentlich differenzirt sind, wäscht sie und bringt sie in Balsam. Es resultirt eine bläulich graue Imprägnation sowohl der Nervenfasern als auch der Ganglien- und Gliazellen und ihrer Fortsätze.

756. Andere Methoden. MONTI (Atti Accad. Lincei Rend. (4) Vol. 5 1889 Sem. 1 p. 707; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 72) erhält eine braune Imprägnation durch Kaliumbichromat und Kupfersulfat. Die Methode scheint aber keine praktische Form angenommen zu haben.

AZOULAY (C. R. Soc. Biol. Paris (10) Tome 1 1894 p. 631) bringt Celloidinschnitte durch das Rückenmark mehrere Male abwechselnd in eine 1 %ige Lösung von Ammoniumvanadat und eine 5 %ige von Tannin, wäscht sie nach kräftiger Färbung mit Wasser, dann mit 90 %igem Alkohol und schliesst sie in Balsam ein.

Ueber die Vergoldung nach Gerlach und Upson s. oben § 374.

c) Spezielle Methoden für die Neuroglia.

757. Weigerts Methode zum Färben der Neuroglia des Menschen (Abh. Senckenb. Ges. Frankfurt 19. Bd. 1895 p. 199). Man bringt Stücke von höchstens 5 mm Dicke auf wenigstens 4 Tage in eine 10 %ige Lösung von Formol und behandelt sie dann 4—5 Tage lang in einem Brütofen (oder wenigstens 8 Tage lang bei gewöhnlicher Temperatur) mit einem Gemisch von 5 Theilen Kupferacetat, $2\frac{1}{2}$ Theilen Chromalaun, 5 Theilen Essigsäure und 95 Theilen Wasser. (Man löse den Chromalaun im Wasser durch tüchtiges Kochen und setze dann erst die Essigsäure und zuletzt das Kupfersalz zu, damit kein grüner Niederschlag entstehe.) Nun wäscht man die Stücke mit Wasser, bettet sie in Celloidin ein und schneidet sie; die Schnitte legt man auf 10 Minuten in eine $\frac{1}{3}$ %ige Lösung von Kaliumhypermanganat, wäscht sie wieder und behandelt sie 2—4 Stunden lang mit einer Lösung von Chromogen. (Dieses Naphthalinderivat wird in den Höchster Farbwerken fabrizirt; zur Lösung nehme man 5 Theile Chromogen, eben so viel Ameisensäure und 95 Theile Wasser, filtrire sorgfältig

und füge zu 90 ccm des Filtrates 10 ccm einer 10 % igen Lösung von Natriumsulfit). Nachher legt man sie über Nacht in eine 5 % ige Lösung von Chromogen, wäscht sie am folgenden Morgen gut aus und färbt sie in einer Modifikation des Fibrinfärbmittels von Weigert. (Diese bereitet man, indem man eine heiss gesättigte Lösung von Methylviolett in 70—80 % igem Alkohol abkühlen lässt, klar abgiesst und mit 5 % einer 5 % igen Lösung von Oxalsäure in Wasser versetzt.) Schliesslich differenzirt man die Schnitte in einem Gemisch gleicher Theile von Anilin und Xylol und bringt sie durch reines Xylol in Balsam.

Leichte Modifikationen s. bei Storch (Arch. Path. Anat. 157. Bd. 1899 p. 129), Krause (Anh. Abh. Akad. Berlin 1899 p. 5) und Aguerre (Arch. Mikr. Anat. 56. Bd. 1900 p. 516). — S. ferner im § 880 die Methode von Benda.

Mallory (*Journ. Exp. Med. Vol. 2 1897 p. 532) fixirt die nicht über 1/2 cm dicken Stücke wenigstens 4 Tage lang in 10 %igem Formol, bringt sie dann auf 4—8 Tage in gesättigte Lösung von Pikrinsäure, von da auf 4—6 Tage bei 37 ° C. (oder auf 4 Wochen bei gewöhnlicher Temperatur) in 5 %ige Lösung von Ammoniumbichromat, die er am 2. Tage wechselt, endlich direkt in Alkohol. Die Celloidinschnitte färbt er nach der Weigertschen Fibrinmethode (unten § 797; zur Entfärbung gleiche Theile von Anilin und Xylol) oder mit Hämatoxylin-Molybdänat (oben § 733).

758. Säurerubin. Kultschitzky (Anat. Anzeiger 8. Jahrg. 1893 p. 357) färbt Paraffinschnitte entweder 5—10 Sekunden lang mit einem Gemisch von 1 g Säurerubin, 400 ccm 2 %iger Essigsäure und 400 ccm konzentr. wässeriger Pikrinsäurelösung oder wenigstens 1/2 Stunde lang mit einem Gemisch von 100 ccm 96 %igem Alkohol und 3—5 ccm obigen Gemisches. Nach gründlichem Auswaschen in Alkohol sind die Ganglienzellen und Axencylinder gelbroth, während die Glia rothviolett ist. — Popow (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 358) rühmt diese Färbung, verwendet aber entweder eine 1 %ige wässrige Rubinlösung mit etwas Jodtinktur einige Sekunden lang und wäscht die Schnitte in absolutem Alkohol aus, oder eine 3 %ige alkoholische Pikrinsäurelösung, die mit Rubin gesättigt ist, 5—10 Minuten lang.

Burchardt (La Cellule Tome 12 1897 p. 364) ist ebenfalls der Ansicht, dass Säurerubin die Neuroglia präziser färbe als Säurefuchsin, und empfiehlt folgendes Gemisch: Pikrinsäure (1:300) 9 Theile, Säurerubin (konzentr. wässerige Lösung) 1 Theil, alsdann direkte Uebertragung in Alkohol. Zum Vorfärben der Kerne dient Methylviolett. Oder: die Kerne mit Fuchsin, und die Fasern mit Poiriers Blau oder Säureviolett in Pikrinsäure gelöst.

759. Eosin und Anilinblau nach Yamagiwa (Arch. Path. Anat. 160. Bd. 1900 p. 360). Material aus Müllers Gemisch wird direkt in absoluten Alkohol gebracht und in Celloidin eingebettet; die Schnitte werden nach Vorfärbung mit Eosin in gesättigter alkoh. Lösung (12 Stunden lang) mit Anilinblau nach Ströbe (oben § 725) gefärbt: Axencylinder blau, Glia roth etc.

---

30. Kapitel.

Einige andere histologische Methoden.

Retina.

S. *Seligmann, Mikrosk. Untersuchungsmeth. d. Auges, Berlin 1899, und *Greeff, Anleitung zur mikrosk. Untersuchung des Auges. 2. Aufl. Berlin 1900.

760. Fixiren und Härten. Um Schnitte durch die Retina kleiner Augen zu machen, fixirt man am besten das ganze uneröffnete Auge in Osmiumsäuredämpfen, z. B. das von *Triton* 10 Minuten lang (Ranvier Traité 1. Ed. p. 954); dann schneidet man es im Aequator durch und legt die hintere Halbkugel auf einige Stunden in Drittelalkohol. Grössere Augen öffnet man besser vorher am Aequator und legt nur die hintere Halbkugel ein.

Mann (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 483) fixirt die Retina in situ durch Injektion von Sublimatlösung in die Aorta (s. oben p. 21). Er nimmt dann das Auge heraus, öffnet es, entfernt Linse und Glaskörper und legt das Auge noch auf 2 Stunden in die warme Sublimatlösung. Ist das Auge aber vor der Fixirung herausgenommen, so öffnet er es vorn, entfernt die Linse, macht einen Kreuzschnitt in den Glaskörper und nimmt auch ihn fort, nachdem er ihn durch leichten Druck auf die Sklera so weit hervorgetrieben hat, dass er sich fassen lässt. Dann taucht er das Auge in die warme Sublimatlösung ein, nimmt es sofort wieder heraus, taucht es wieder ein etc., bis der Augapfel ganz voll Flüssigkeit ist, und lässt es nun 3 Stunden lang im warmen Sublimat liegen. Schliesslich öffnet er es in Normalsalzwasser durch 4 Schnitte durch die Sklera; bei sorgfältiger Manipulation hat die Retina keine Falten.

L. Johnson (in litt.) fixirt die Augen uneröffnet, indem er sie einige (bei erwachsenen Menschen 5, bei Kindern, Kaninchen, Affen und überhaupt kleineren

Säugern nur 1—3) Minuten lang über Dämpfen einer 2 %igen Osmiumsäure räuchert. Sobald sich die Sklera fest anfühlt, wird sie mit einem Rasirmesser dicht hinter dem Ciliarkörper durch einen leichten Einschnitt geöffnet (aus grossen Augen wird Cornea und Linse entfernt), und das Auge auf 12 Stunden in das Gemisch von Osmiumsäure etc. (oben § 57) gelegt, später unter der Wasserleitung ausgewaschen, 2 Tage lang in einer 2½%igen Lösung von Kaliumbichromat aufgehängt und zuletzt in Alkohol (von 20% an) nachgehärtet. — Auch wenn man andere Gemische anwendet (Flemmingsches oder Müllersches etc.), muss man stets vorher das Auge gut mit Osmiumsäure geräuchert haben. Gemische mit Formaldehyd empfiehlt J. nicht.

Leber (*Münch. Med. Wochenschr. 41. Jahrg. 1894; Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 256) bestätigt Hermanns Angaben (oben § 108) und empfiehlt zum Konserviren 1 Theil Formol und 9 Theile Wasser; haben die Augen einige Tage darin gelegen, so soll man sie ohne Schaden durchschneiden können. Die Retina sei wenigstens so gut konservirt wie in Müllers Gemisch. Dann könne man die Augen direkt in immer stärkeren Alkohol bringen, wobei der Glaskörper etwas schrumpfe, aber kaum so viel wie nach Müllers Gemisch. — S. auch Hippel (Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd. 1899 p. 79: Formol sei vorzüglich für die Retina). — Benda (Verh. Ges. D. Naturf. Aerzte 71. Vers. 2. Th. 2. Hälfte 1900 p. 459) empfiehlt, um Faltungen der Retina zu vermeiden, Fixirung in 10%iger Salpetersäure (24 Stunden) und Härtung in Müllers Gemisch (ebenso lang).

761. Färben. Kuhnt (Jena. Zeit. Naturw. 24. Bd. 1889 p. 177) färbt nach Weigert und Pal (oben § 703), Dogiel mit Methylenblau (oben § 303 u. 305).

Schaffer (Sitzungsb. Akad. Wien 99. Bd. 3. Abth. 1890 p. 113; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 227) behandelt die Schnitte zuerst einige Stunden lang mit 1%iger Chromsäure, wäscht sie nur kurz mit Wasser, bringt sie auf 20 Stunden in Kultschitzkys Hämatoxylin (oben p. 367) und differenzirt sie 12 Stunden lang in Weigerts Lösung von rothem Blutlaugensalz (oben p. 364).

Krause (Internation. Monatschr. Anat. Hist. 1. Bd. 1884 p. 227) behandelt die frische Retina mit einer 1%igen Lösung von Eisen- oder einer 2%igen von Vanadiumchlorid und nachher mit einer 2%igen Lösung von Gerb- oder Pyrogallussäure. So färben sich nur die Körnerschichten und die Kerne der Ganglienzellen. Die Elemente der anderen Schichten mag man mit Säurefuchsin oder einem anderen Theerfarbstoff färben. — Lennox (*Arch. Ophth. 32. Bd. 1. Heft; Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 408) färbt mit Hämatoxylin nach Weigert; Cuccati (Mem. Accad. Bologna (4) Tomo 7 1887 p. 203) mit konzentrirter Lösung von Säurefuchsin und schliesst in Balsam ein.

S. auch BERNHEIMER (Sitzungsb. Akad. Wien 90. Bd. 3. Abth. 1884 p. 137) und RAMÓN Y CAJAL (*Rev. Trimestr. Hist. Tomo 1 1888 p. 1 und Anat. Anzeiger 4. Jahrg. 1889 p. 111; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 373).

COLUCCI (Giorn. Ass. Med. Natural. Napoli Anno 5 1894 p. 5; Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 87) empfiehlt vor Allem Paladinos Imprägnation mit Jodpalladium (oben § 715).

Ueber das Bleichen der Retina s. § 568, 571, 574 und 697.

762. Maceriren. Man kann zunächst in $^1/_5$—$^1/_2$ %iger Osmiumsäure fixiren und dann 2—3 Tage lang in $^1/_{50}$ %iger Chromsäure (M. Schultze) oder in Jodserum (M. Schultze), in schwachem Alkohol (Landolt), in Müllers Gemisch oder endlich in Wasser (Ranvier, Traité 1. Ed. p. 957) maceriren. — THIN (Journ. Anat. Phys. London Vol. 14 1879 p. 139) fixirt 36—48 Stunden lang in Drittelalkohol oder in 25 %igem Alkohol, färbt dann und zerzupft. — SCHIEFFERDECKER macerirt die frische Retina einige Tage lang in seinem Methylgemisch (oben § 541). — ANDRÉ (*Journ. Anat. Phys. Paris 1874 p. 96) macerirt in starken Lösungen von Chloralhydrat (2 g auf 15 ccm Wasser, dazu auch wohl 8 ccm Glycerin), KRAUSE (Internation. Monatschr. Anat. Hist. 1. Bd. 1884 p. 152) in einer 10 %igen. Nach BARRETT (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 26 1886 p. 607) halten sich Stäbchen und Zapfen auf diese Weise vorzüglich.

Inneres Ohr.

763. SCHWALBE (*Beitr. Phys. Festschrift f. Ludwig 1887; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 90) fixirt die Schnecke von *Cavia* 8 bis 10 Stunden lang in Flemmings Gemisch, wäscht sie in Wasser, entkalkt sie 24 Stunden lang in 1 %iger Salzsäure, säuert sie aus und bringt sie zum Schneiden in Paraffin. — S. auch § 566 (FERRERI).

PRENANT (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 9. Bd. 1892 p. 28; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 379) öffnet die Schnecke in Hermanns oder Flemmings Gemisch, fixirt sie 4—5 Stunden lang darin, nimmt zum Entkalken, das er lieber ganz vermeidet, 1 %ige Lösung von Palladiumchlorür (nach P. Meyer 1876) und färbt die Paraffinschnitte mit Safranin oder mit Methylviolett B, oder mit Anilingrün und Orange, oder mit Eosin und Hämatoxylin nach Renaut. Zur Isolirung der Stria vascularis legt er die Schnecke auf 1 Tag in 1 %ige, dann auf 4—5 Tage in $^1/_{10}$ %ige Osmiumsäure: die Stria lässt sich im Zusammenhang abheben.

Waldeyer (Strickers Handbuch p. 958) entkalkt entweder in „Chlorpalladium (0,001 pc.) mit $^1/_{10}$ Theil Salzsäure“ oder in $^1/_4$—1%iger Chromsäure. — Pritchard (Journ. R. Micr. Soc. London 1876 p. 211) entkalkt in 1%iger Salpetersäure.

Lavdowsky (Arch. Mikr. Anat. 13. Bd. 1877 p. 497) behandelt die frische Schnecke mit 1%iger Lösung von Höllenstein, wäscht sie 10 Minuten lang in Wasser mit etwas $^1/_2$- oder 1%iger Osmiumsäure und schliesst sie in Glycerin ein.

S. ferner Flesch (Arch. Mikr. Anat. 15. Bd. 1878 p. 300) und Tafani (Arch. Ital. Biol. Tome 6 1884 p. 208); Politzer, Anat. u. hist. Zergliederung d. menschl. Gehörorganes, Stuttgart 1889 (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 364); Eichler (*Abh. Math. Physik. Cl. Sächs. Ges. Wiss. 18. Bd. 1892 p. 311; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 380: genaue Anleitung zur Injektion der Blutgefässe); *Siebenmann, Blutgefässe im Labyrinthe d. menschl. Ohres, Wiesbaden 1894 (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 386); Brühl (Anat. Anzeiger 14. Bd. 1898 p. 418: Hohlräume im Ohr); Denker (Anat. Hefte 2. Abth. 9. Bd. 1900 p. 300: ebenso); Stein (Anat. Anzeiger 17. Bd. 1900 p. 398: s. oben § 550).

Elektrische Organe.

764. Torpedo. Ballowitz (Arch. Mikr. Anat. 42. Bd. 1893 p. 460 etc.) behandelt die frischen Säulen vorzugsweise nach Golgi mit Höllenstein, zur Kontrole auch mit 1%iger Osmiumsäure (1—2 Tage lang, dann zerzupft und direkt in Wasser untersucht oder mit Gentianaviolett etc. gefärbt). Die Fixirung mit Flemmings Gemisch, Chlorpalladium und Salpetersäure von 3—5% gibt nicht so gute Resultate; die Vergoldung und namentlich die Versilberung des frischen Gewebes sind ebenfalls nicht geeignet. (B. bespricht die älteren Methoden ausführlich.)

Iwanzoff (Bull. Soc. Natural. Moscou (2) Tome 8 1895 p. 407) untersucht die Platten entweder in der Cerebrospinalflüssigkeit des Thieres oder fixirt sie besonders gut, indem er zunächst Osmiumsäure von $^1/_2$—2% interstitiell einspritzt und die nach einigen Minuten herausgeschnittenen Säulen in 2%igem Kaliumbichromat (oder Ammoniumbichromat oder Müllers Gemisch) härtet, dann nach dem Abspülen mit Wasser direkt in einer wässerigen oder alkoholischen Lösung von Hämatoxylin färbt und eventuell in Paraffin schneidet. (J. hat auch sehr viele andere Methoden probirt, s. hierüber und über die seiner Vorgänger das Original.)

S. auch Krause (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 4. Bd. 1887 p. 376).

765. Raja. IWANZOFF (Bull. Soc. Natural. Moscou (2) Tome 9 1895 p. 74) fixirt das Organ im Schwanze von *Raja* hauptsächlich mit Flemmings Gemisch, färbt es vor dem Schneiden mit Hämacalcium und Eosin und untersucht es in Balsam oder besser in Kaliumacetat.

BALLOWITZ (Anat. Hefte 1. Abth. 7. Bd. 1897 p. 285) verwendet zur Untersuchung des elektrischen Organs im Schwanze von *Raja* alle gebräuchlichen Methoden. Fixirung am besten in konzentrirter Lösung von Sublimat in Seewasser oder 0,6 %igem Salzwasser, oder auch in Flemmings Gemisch. Die Schnitte werden besser in Wasser untersucht, da Oel und Balsam zu sehr aufhellen. Die Golgische Methode leistet viel.

766. Mormyrus. S. OGNEFF (Zeit. Wiss. Z. 64. Bd. 1898 p. 567).

Bindegewebe.

767. Bindegewebe. MAYER (Sitzungsb. Akad. Wien 85. Bd. 3. Abth. 1882 p. 77) empfiehlt zum raschen und kräftigen Färben frischen Gewebes seine Lösung von Methylviolett B (oben § 340); auch die elastischen Fasern und glatten Muskeln färben sich damit, aber anders.

Ferner FLEMMING (Internation. Beitr. Wiss. Med. 1. Bd. 1891 p. 213; Zeit Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 225) über die Entwicklung der Bindegewebfasern. -- Ueber künstliche Oedeme zum Studium des areolären Gewebes s. RANVIER (Traité 1. Ed. p. 329).

FREEBORN (*Amer. Month. Micr. Journ. Vol. 9 1888 p. 231; Journ. R. Micr. Soc. London 1889 p. 305) färbt Schnitte 3 Minuten lang mit Pikronigrosin (10 ccm 1 %iger wässeriger Lösung von Nigrosin und 90 ccm konzentrirter wässeriger Lösung von Pikrinsäure), wäscht sie mit Wasser und bringt sie in Balsam: Bindegewebfasern hellblau, Kerne schwärzlich, alles Uebrige grünlich gelb. — S. auch SCHAFFER (Zeit. Wiss. Z. 66. Bd. 1899 p. 237).

Ueber die Färbung mit Säurefuchsin und Pikrinsäure s. oben § 315 (speziell Hansen und Schaffer), über die mit Pikroindigkarmin § 345. — S. auch unten § 810 (MAAS) und § 883.

768. Bindegeweb- und Plasmazellen. LÖWENTHAL (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 309) fixirt kleine Stücke vom subcutanen Gewebe zwischen den Schulterblättern der weissen Ratte 24 Stunden lang im Gemisch von Golgi (oben § 738), wäscht sie gut aus, legt sie auf 36—48 Stunden in Alkohol von 70 % und färbt sie mit Delafields Hämatoxylin oder mit Alaunkarmin. — Auch MERKEL (Verh. Anat. Ges. 9. Vers. 1895 p. 42) und SPULER (Anat. Hefte 7. Bd. 1896 p. 130)

fixiren mit diesem Gemisch. SPULER färbt mit „Alauncampeche“ (oben § 238), Eisenhämatoxylin etc.

769. Färben der Fibrillen. BENECKE (Verh. Anat. Ges. 7. Vers. 1893 p. 165; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 79) färbt sie fast genau so wie Kromayer (oben § 647) die Plasmafasern. — RIBBERT (Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1899 p. 93) empfiehlt Mallorys Hämatoxylin und Phosphormolybdänsäure (oben § 733).

770. Färben des Collagens. UNNA (Monatsh. Prakt. Derm. 18. Bd. 1894 p. 509; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 518) zieht der Methode von Benecke (§ 769) die beiden folgenden vor, wenn man nicht nur die Collagenfasern, sondern auch die Grundsubstanz und die übrigen Elemente im Präparate gefärbt haben will.

a) Die Methode mit Orceïn. Schnitte von Material aus Alkohol färbt man in Grüblers starker Lösung von polychromem Methylenblau (unten § 774), bringt sie auf 1/4 Stunde in eine neutrale 1%ige Lösung von Orceïn in absolutem Alkohol, wäscht sie mit Alkohol und führt sie durch Bergamottöl in Balsam über: Kerne blau, collagene Grundsubstanz dunkelroth, Körner in den Mastzellen karminroth, Plasmazellen blau.

b) Die Methode mit Sulfosalzen: 1) man färbt die Schnitte 5—10 Minuten lang in einer 2%igen wässerigen Lösung von Säurefuchsin, spült sie ab, behandelt sie 1—2 Minuten lang mit konzentr. wässeriger Lösung von Pikrinsäure, entwässert sie 2 Minuten lang in konzentrirter Lösung von Pikrinsäure in absolutem Alkohol, wäscht sie mit Alkohol ab und bringt sie in Balsam. Oder 2) man färbt sie 20 Sekunden lang in Wasserblau (1%iger wässeriger Lösung), wäscht sie ab, färbt sie 5 Minuten lang in Safranin (1%iger wässeriger Lösung), wäscht sie wieder, legt sie in absoluten Alkohol, bis sie wieder blau werden, und bringt sie in Balsam.

771. Fettzellen. FLEMMING (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 39, 178) macht darauf aufmerksam, dass osmirtes Fett sich in Terpentinöl (Dekhuyzen), Aether und Kreosot (P. Mayer) sehr rasch, langsam dagegen in Xylol, Nelkenöl oder Chloroform löse. Fixirt man daher Fettgewebe mit einem Osmiumgemisch, färbt es mit Safranin oder Gentianaviolett und schafft das Fett durch Terpentinöl fort, so erhält man gute Präparate zum Studium der Fettzellen. (S. auch oben § 38.) Will man hingegen das Fett nicht extrahirt haben, so nehme man

zum Einbetten in Paraffin nur Chloroform (oder Nelkenöl), zum Einschluss Xylolbalsam. Flemming osmirt in 1—2%iger Osmiumsäure 12—24 Stunden lang bei Abschluss des Lichtes und wäscht dann lange mit Wasser aus. Das Fett wird erst in Alkohol schwarz. — S. hierzu auch STARKE (Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. 1895 p. 70).

Nach WLASSAK (Arch. Entwickelungsmech. 6. Bd. 1898 p. 466) zieht Petroläther osmirtes Fett nicht aus; ebenso nach NICOLAS (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 8. Bd. 1891 p. 3) Cedernöl nicht, und nach HANDWERCK (Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1899 p. 185) kaltes Benzin gar nicht, warmes bei nicht zu langer Wirkung nicht nachweisbar.

772. Fett. DADDI (Arch. Ital. Biol. Tome 26 1896 p. 143) färbt Fett in den Geweben mit konzentrirter Lösung von Sudan III in Alkohol, indem er Stücke der womöglich mit Müllers Gemisch konservirten Gewebe 5—10 Minuten lang hineinlegt, eben so lang mit Alkohol auswäscht, mit Fliesspapier abtrocknet und in Glycerin untersucht. Die kleinen Fetttropfen sind gelb, die grösseren orangeroth, weiter färbt sich Nichts. Die Schnitte sind aus freier Hand oder mit dem Gefriermikrotom zu machen, um das Fett nicht auszuziehen. Das Myelin der Nerven wird nur ganz hellgelb.

Ich (MAYER) kann diese einfache Methode aus eigener Erfahrung empfehlen; zur Lösung nehme ich 70%igen Alkohol und färbe die Objekte gewöhnlich vorher mit Hämalaun. Wenn PFLÜGER (Arch. Gesammte Phys. 81. Bd. 1900 p. 379) angibt, das Sudan III sei in Glycerin löslich, so ist das bei dem von Grübler & Hollborn bezogenen Präparate nicht der Fall.

HANDWERCK (Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1899 p. 177) hält die Osmiumsäure für ein feineres Mittel zur Entdeckung des Fettes in den Geweben als das Sudan; er hebt ferner hervor, dass beide Stoffe nur auf Oelsäure und Oleïn, nicht aber auf die festen Fettsäuren und ihre Glyceride als Reagens dienen können. — RIEDER (ibid. p. 211) scheint das Sudan vorzuziehen. S. auch ROSENTHAL (*Verh. Path. Ges. 2. Tag. 1900 p. 440).

UNNA (Monatsh. Prakt. Derm. 26. Bd. 1898 p. 601; Verh. Anat. Ges. 12. Vers. 1898 p. 16) hat in der Haut das Fett durch seine „sekundäre Osmirung“ nachweisen wollen; indessen zeigt MERK (Sitzungsb. Akad. Wien 108. Bd. 3. Abth. 1899 p. 362), dass Unna durch sein neues Fixirgemisch in die Gewebe Gerbsäure schafft, die bekanntlich die Osmiumsäure reduzirt. — Aehnlich WEIDENREICH (Arch. Mikr. Anat. 57. Bd. 1901 p. 611).

BENDA (Arch. Path. Anat. 161. Bd. 1900 p. 194) empfiehlt Weigerts Neurogliabeize (oben § 757) zur Entdeckung freier Fettsäuren oder ihrer Kalksalze in den Geweben: es bilden sich die Kupfersalze.

Ueber den Nachweis von Fett durch Chinolinblau (Cyanin) s. oben § 334. S. ferner die komplizirte Methode von LEVINSON (Zeit. Wiss. Mikr. 17. Bd. 1900 p. 321: Chromhämatoxylin nach Weigert, stark modifizirt).

773. Mastzellen. EHRLICH (Arch. Mikr. Anat. 12. Bd. 1876 p. 265) legt die frischen Gewebe direkt in eine Lösung von Dahlia in etwas mit Essigsäure angesäuertem Alkohol von 30% oder färbt die nur in starkem Alkohol gehärteten Gewebe wenigstens 12 Stunden lang mit einer beinahe konzentrirten Lösung von Dahlia in einem Gemisch aus 1 Theil Essigsäure und 12 Theilen Drittelalkohol. Dann differenzirt er sie in absolutem Alkohol und schliesst sie in verharztes Terpentinöl ein. Aehnlich kann man auch Lösungen von Primula, Jodviolett, Cyanin, Safranin, Fuchsin und Methylviolett (dies ist das beste) in Drittelalkohol mit 5% Essigsäure verwenden.

WESTPHAL (*Ueber Mastzellen. Dissert. 1880) färbt in den Mastzellen ausser den Körnern die Kerne durch folgendes Gemisch: Alaunkarmin, Glycerin und „stark dahliahaltiger“ absoluter Alkohol je 100, Essigsäure 20 ccm. Färbung 24 Stunden lang.

NORDMANN (Internation. Monatschr. Anat. Hist. 2. Bd. 1885 p. 191) färbt die Schnitte unter Anderem einige Minuten lang mit konzentrirter wässeriger Lösung von Vesuvin plus 4—5% Salzsäure und bringt sie durch absoluten Alkohol in Balsam. Er gibt auch eine ausführliche Schilderung der mikrochemischen Reaktionen der Körnerzellen.

774. Plasmazellen und Mastzellen. UNNA (Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1892 p. 482) färbt die Schnitte mit seinem polychromen Methylenblau.

a) Plasmazellen. Eine Lösung von 1 Theil Methylenblau, $^1/_{20}$ Theil Aetzkali und 100 Theilen Wasser verdünnt man mit dem 10—100 fachen an Anilinwasser und färbt damit Material aus Alkohol (allenfalls aus Sublimat und Alkohol, nicht aber aus Chromgemischen) $^1/_2$ Stunde lang bis über Nacht, entwässert es rasch in absolutem Alkohol, differenzirt es in Kreosol, wäscht es mit Xylol ab und bringt es in Balsam.

b) Gewebe und Plasmazellen. Man dampft eine Lösung von je 1 Theil Methylenblau und Kaliumkarbonat in 20 Theilen Alkohol und 100 Theilen Wasser auf dem Wasserbade langsam bis auf 100 Theile ein und benutzt das an Methylenviolett reich gewordene Gemisch entweder direkt oder nach Verdünnung mit gleich viel Anilinwasser. Differenzirung mit Glycol, Styron oder Kreosol.

c) Mastzellen und Plasmazellen. Eine Lösung von je 1 Theil Methylenblau und Kaliumkarbonat (oder dem Natron- oder Ammoniaksalz) in 100 Theilen Wasser (Aq. carbolisata, chloroforma) verdünnt man etwa auf das 100fache, färbt darin die Schnitte langsam, behandelt sie mit Alkohol von 70—80 %, differenzirt sie in Styron und bringt sie durch Bergamottöl oder Xylol in Balsam. Die Körner in den Mastzellen färben sich roth, da sich im Farbbade Methylenroth gebildet hat. Plasmazellen blau.

S. ferner UNNA (*Monatsh. Prakt. Derm. 12. Bd. 1891 p. 296 und 19. Bd. 1894 p. 225; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 92 und 12. Bd. 1895 p. 58), VAN DER SPEK & UNNA (*ibid. 13. Bd. 1891 p. 364; ibid. 9. Bd. 1892 p. 89).

Ueber die Farbstoffe, die im polychromen Methylenblau existiren mögen, s. oben § 326 (NOCHT etc.).

BERGONZINI (Anat. Anzeiger 6. Jahrg. 1891 p. 595) färbt Schnitte von Material aus Alkohol oder Sublimat 3—4 Minuten lang in einem Gemisch von $^2/_{10}$ %igen Lösungen von Säurefuchsin (1 Vol.), Methylgrün (2 Vol.) und Goldorange (2 Vol.), wäscht sie 1—2 Minuten lang in Wasser, 2 Minuten lang in absol. Alkohol und bringt sie durch Kreosot (oder Bergamottöl) und Terpentinöl in Balsam. Man kann auch statt des Goldorange, von der eine Sorte das Methylgrün ausfällt, Orange G nehmen, sodass man ähnlich wie nach Ehrlich-Biondi färbt.

775. **Plasmazellen.** JADASSOHN (*Arch. Derm. Syph. Ergänz. Heft 1 1892 p. 58; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 226) überfärbt kurze Zeit mit Thionin in „stark alkalischer (1 : 2000) oder Boraxlösung“ und wäscht mit angesäuertem Wasser aus. — S. auch MARSCHALKÓ (*Arch. Derm. Syph. 30. Bd. 1895 p. 3; Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 64) und KROMPECHER (ibid. 15. Bd. 1899 p. 458).

776. Clasmatocyten. RANVIER (C. R. Acad. Sc. Paris Tome 110 1890 p. 165) spannt das Mesenterium von Batrachiern oder ein Stück des Netzes von Säugethieren auf einem Objektträger gut aus, lässt einige Tropfen 1 %iger Osmiumsäure darauf fallen, wäscht nach 1 bis 2 Minuten mit Wasser aus und färbt mit einer auf das Zehnfache verdünnten gesättigten wässerigen Lösung von Methylviolett 5 B. In Glycerin ist die Färbung nicht haltbar.

777. Elastisches Gewebe. Die elastischen Fasern sind durch ihre grosse Verwandtschaft zur Osmiumsäure — sie färben sich damit viel rascher als die meisten übrigen Gewebe — und durch ihre Unver-

änderlichkeit in Natron- oder Kalilauge ausgezeichnet. Auch zu einigen Theerfarbstoffen, besonders Viktoriablau, zeigen sie eine grosse Neigung.

Eine Uebersicht über die älteren Methoden von Balzer, Unna, Lustgarten (oben p. 196) und Herxheimer gibt G. MARTINOTTI (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 31); selber fixirt er das Gewebe in $^1/_5$ $^0/_0$iger Chromsäure, wäscht es aus, färbt es 48 Stunden lang in Safranin (5 g auf 100 ccm absol. Alk. und 200 ccm Wasser), wäscht es, entwässert es und schliesst es durch Nelkenöl in Balsam ein. Die elastischen Fasern färben sich tief schwarz.

In einem Brütofen geht die Färbung rascher vor sich (GRIESBACH in: Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 442). — Nach FERRIA (ibid. 5. Bd. 1888 p. 343) werden die Präparate deutlicher, wenn man die Schnitte 24 Stunden in Alkohol lässt oder kurz mit ganz schwacher Lösung von Aetzkali in Alkohol behandelt, weil die anderen Gewebe mehr entfärbt werden.

MIBELLI (Monitore Z. Ital. Anno 1 1890 p. 17; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 225) gibt eine andere Methode mit Safranin an, die aber zu ängstliches Aufpassen auf allerlei Kleinigkeiten zu erfordern scheint.

Ueber das elastische Gewebe in der Haut s. PASSARGE & KRÖSING (*Dermat. Stud. 18. Bd. 1894), über die Färbung und Isolirung der elastischen Fasern AGABABOW (Arch. Mikr. Anat. 50. Bd. 1897 p. 566), über die Versilberung C. MARTINOTTI (Arch. Ital. Biol. Tome 11 1889 p. 257; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 521).

LOISEL (Journ. Anat. Phys. Paris 33. Année 1897 p. 134) fixirt zum Studium der Entwicklung der elastischen Fasern bei Embryonen von Säugern und Selachiern die Gewebe ja nicht mit sauren Gemischen, sondern mit „sublimé faible" oder Müllers Gemisch, schneidet sie in Paraffin und färbt sie mit Orceïn und Salzsäure in alkoholischer Lösung (1:200). — S. auch RETTERER (C. R. Soc. Biol. Paris (10) Tome 5 1898 p. 744: Sublimat oder Zenkers Gemisch) und GARDNER (Biol. Centralbl. 17. Bd. 1897 p. 398: Fixirung in Müllers Gemisch; Färbung mit Fuchsin in salpetersaurer Lösung nach Unna, Entfärbung mit 25 $^0/_0$iger Kalilauge oder mit 25 $^0/_0$iger Salpetersäure. Oder: Fixirung in einem frischen Gemisch von 4 Theilen konzentr. Lösung von Kupfersulfat und 1 Theil 1 $^0/_0$iger Osmiumsäure „mit nachfolgender Bearbeitung der Gewebe mittels Gallussäure").

Unnas neuere Methode mit Orceïn (Monatsh. Prakt. Derm. 19. Bd. 1894 p. 398; Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 240). Man löst 1 Theil von Grüblers Orceïn in 100 Theilen absol. Alkohol, fügt 1 Theil Salzsäure hinzu, übergiesst mit dieser Lösung die Schnitte in einer Porzellanschale, bis sie gerade bedeckt sind, und erwärmt die Schale auf 30° C. Nach 10—15 Minuten ist die Lösung durch Verdunstung ganz dick geworden; dann spült man die Schnitte in Alkohol ordentlich ab und bringt sie in Balsam. Elastin dunkel, Collagen hell braun.

Unnas ältere Methode, die sogenannte Tänzersche, s. in *Monatsh. Prakt. Derm. 12. Bd. 1891 p. 394; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 94; s. ferner ZENTHÖFER (*Derm. Stud. 14. Heft 1892; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 509); KÖPPEN (ibid. 6. Bd. 1890 p. 473; 7. Bd. 1890 p. 22); BURCI (*Atti Soc. Toscana Sc. N. Tomo 7 1891 p. 251; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1891 p. 831, f. 1892 p. 292); HANSEN (Arch. Path. Anat. 137. Bd. 1894 p. 25; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 383); KULTSCHITZKY (Arch. Mikr. Anat. 46. Bd. 1895 p. 673); GÜNTHER (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 230); SCHIEFFERDECKER (ibid. p. 302); GUERRINI (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 15. Bd. 1898 p. 37).

TRIEPEL (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 31) färbt kleine Objekte, die in Alkohol fixirt worden sind, in toto mit einer konzentrirten Lösung von Orceïn (1 g auf 140 ccm 70 %igen Alkohol und 40 Tropfen konzentr. Salzsäure) 24 Stunden lang, wäscht sie mit saurem 70 %igem Alkohol (1 % H Cl) kurze Zeit aus und bettet sie in Paraffin ein.

Weigerts Methode. WEIGERT (Centralbl. Allg. Path. 9. Bd. 1898 p. 290) bringt eine Lösung von 2 g Fuchsin (oder Para- oder Neufuchsin) und 4 g Resorcin in 200 ccm Wasser zum Kochen, fügt 25 ccm Liquor ferri sesquichlor. Pharm. Germ. III hinzu und lässt unter Umrühren noch einige Minuten kochen. Der schlammige Niederschlag wird abfiltrirt und in 200 ccm Alkohol von etwa 94 % heiss gelöst; zur kalten Lösung gibt man 4 ccm Salzsäure. Die Schnitte werden darin 1/3—1 Stunde lang gefärbt, mit Alkohol nur abgewaschen und durch Xylol (s. hierüber oben p. 77) in Balsam gebracht. Elastische Fasern dunkelblau, fast schwarz; die Kerne können vor- oder nachher mit Karmin gefärbt werden. — S. auch § 881.

SMIRNOW (s. Ksjunin in: Arch. Mikr. Anat. 57. Bd. 1900 p. 134) hellt die Präparate mit Ol. Origani auf. — Daselbst Abänderung der Methode mit Orceïn: Smirnow färbt mit einem Gemisch von 1 1/2 g Orceïn, 120 ccm absol. Alkohol, 60 ccm Wasser, 60 Tropfen Salzsäure und 1/2 g Pikrinsäure.

778. Ueber die Gitterfasern in Leber und Milz s. unten § 811.

Knochen, Zähne und Knorpel.

779. Allgemeines. Eine sehr ins Einzelne gehende Uebersicht über die gesammte Technik der Untersuchung gibt SCHAFFER (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 167—211).

SCHULTZE (Verh. Anat. Ges. 11. Vers. 1897 p. 3) macht zum Studium der Skelettbildung die konservirten Embryonen mit Kalilauge und Glycerin durchsichtig.

780. Isolirung der Skeletttheile. THILO (Anat. Anzeiger 12. Bd. 1896 p. 244) bringt zur Isolirung des knorpligen oder knöchernen Skelettes die Fische auf 24 Stunden in Wasser, dann auf eine bis

mehrere Wochen in verdünnte Schwefelsäure (1 Vol. englische Säure und 10 Vol. Wasser), isolirt das Skelett und entsäuert es erst in Wasser, dann in einer konzentr. Lösung von Barythydrat oder einer Sodalösung (1 : 30). Um den Kalk in den Knochen gar nicht angegriffen zu haben, verdünnt man die Schwefelsäure statt mit Wasser mit 70—80 %igem Alkohol.

781. Schleifen der Knochen und Zähne ohne Weichtheile. Ranvier (Traité 1. Ed. p. 297) gibt einige wichtige Maassregeln bei der Anfertigung von Schliffen an. Damit sich die Knochen nicht mit Fett infiltriren, legt man sie sofort nach der Entfernung der Weichtheile in Wasser und zersägt sie noch nass in quere Stücke. Ferner spült man das Mark mit einem Wasserstrahl heraus, lässt die Knochen einige Monate lang unter häufigem Erneuern des Wassers maceriren und trocknet sie dann; sie müssen weiss wie Elfenbein und auf den Schnittflächen gleichmässig matt aussehen. Nun sägt man eine dünne Scheibe aus und schleift sie auf einem Stück Bimstein (dies werde in der Richtung der Fasern aus kompaktem Steine geschnitten) nass mit dem Finger auf beiden Seiten glatt; dann nimmt man einen anderen Stein zu Hülfe und schleift sie zwischen beiden weiter. Ist sie endlich beinahe durchsichtig, so polirt man sie mit dem Finger auf einem nassen Abziehstein oder lithographischen Stein. Spongiöse Knochen tränkt man mit Gummi arab. und trocknet sie vor dem Abschleifen. S. übrigens die Methode von Koch mit Copal, oben p. 119, und die von Ehrenbaum mit Kolophonium, oben p. 120.

Schaffer (l. c. p. 171) nimmt zum Schleifen und Poliren verschiedene Schleifsteine: der gröbste ist ein künstlicher Schmirgelstein, der feinste Lithographirschiefer. Zerbrechliche Knochen werden in einen Tropfen Siegellack eingehüllt und damit geschliffen, noch besser aber in dicken Kanadabalsam unter vorsichtigem Erwärmen eingeschmolzen, mit der Laubsäge zerschnitten und nun geschliffen.

Schaffer (l. c.) empfiehlt zum Zersägen der Knochen die Kreissäge von Csokor (Verh. Anat. Ges. 6. Vers. 1892 p. 270), da man mit ihr frische Knochen ohne jegliche Vorbereitung in Serienschnitte bis zu nur 120 μ Dicke herab zerlegen könne.

Ferner kann man die Schliffe auch zunächst abfeilen (Busch in: Arch. Mikr. Anat. 14. Bd. 1877 p. 490; Höhnel in: Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 234) und erst nachher auf den Schleifstein bringen.

White (Journ. R. Micr. Soc. London f. 1891 p. 307) sägt oder schleift Scheiben von Knochen oder Zähnen ziemlich dünn, legt sie auf wenigstens

24 Stunden in Aether, dann auf 2—3 Tage in ein dünnflüssiges Kollodium, worin Fuchsin aufgelöst ist, endlich in Alkohol zur Härtung des Kollodiums. Nun schleift er sie mit Wasser und Bimstein dünn und schliesst sie bei möglichst geringer Erwärmung in dicken Balsam oder Styrax ein. Alle Lücken, Kanäle etc. sind dann mit dem gefärbten Kollodium angefüllt.

Ruprecht (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 21) feilt die Sägeschnitte auf 0.3 mm Dicke ab, legt sie in Aether, erhitzt sie trocken auf einer Platte, lässt sie noch heiss in Aether und von hier aus in eine siedende konzentr. Lösung von Fuchsin in absol. Alkohol gleiten, nach 5 Minuten das Färbbad unter 34° C. abkühlen und wieder bei 70° mit den Schnitten zur Trockne eindampfen. Dann kratzt er unter Vermeidung aller Feuchtigkeit das Fuchsin aussen von den Schliffen ab und schleift diese zwischen zwei matten Gläsern mit Bimsteinpulver, wasserfreiem Benzin und etwas Vaselin, ferner auf einem Arkansasstein, polirt sie zwischen Schreibpapier und schliesst sie in Benzolkolophonium ein. — Aehnlich verfährt Zimmermann (Verh. Anat. Ges. 3. Vers. 1890 p. 142).

Matschinsky (Arch. Mikr. Anat. 39. Bd. 1892 p. 161) tränkt den Knochen mit Gummilösung, härtet diese in 95 %igem Alkohol, trocknet sie an der Luft und schleift trocken.

782. Schleifen der Knochen und Zähne mit den Weichtheilen. Weil (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 200) legt die mit einer Laubsäge in 2 oder 3 Stücke zerschnittenen frischen Zähne zum Fixiren der Weichtheile auf mehrere Stunden in konzentrirte Sublimatlösung, bringt sie durch Wasser und 30—90 %igen Alkohol (mit etwas Jod) in absoluten Alkohol, färbt sie mit Boraxkarmin, führt sie durch Alkohol in Chloroform über, bringt sie in eine dünne Lösung von hartem Kanadabalsam in Chloroform, konzentrirt diese nach 24 Stunden durch Zusatz von Balsam und verdampft auf dem Wasserbade unter allmählichem Steigern der Wärme (bis auf 90°) alles Chloroform. Dann schleift er wie gewöhnlich.

Röse (Anat. Anzeiger 7. Bd. 1892 p. 512), der Kochs Methode (oben § 175) auf Zähne anwendet, durchtränkt den Zahn sehr langsam und sorgfältig erst mit einem Gemisch von Alkohol und Cedernöl, dann mit reinem Cedernöl, darauf mit einem Gemisch von Cedernöl und Xylol oder Chloroform, endlich mit reinem Xylol oder Chloroform und bringt ihn nun in eine dünne Lösung von Dammar in Xylol oder Chloroform, die er im Sandbade allmählich zur Trockne verdampft. Ferner (ibid. 14. Bd. 1897 p. 54) behandelt er Schliffe von den in Alkohol aufbewahrten Zähnen oder Knochen nach Golgi (je 24 Stunden lang in $^1/_2$ %iger Lösung von Kaliummonochromat und $^3/_4$ %iger Lösung von Höllenstein), polirt sie und schliesst sie trocken in harten Balsam ein. Alle organische Substanz sei dann geschwärzt.

S. auch COLQUHOUN (Journ. Anat. Phys. London Vol. 34 1899 p. 84).

Nach NEALEY (Amer. Month. Micr. Journ. Vol. 5 1884 p. 142; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1885 p. 348) kann man ganz frische Stücke von Knochen oder Zähnen mit Schmirgel auf einer Drehscheibe für Zahnärzte schleifen und erhält so in 1/2 Stunde gute Schliffe mit den Weichtheilen in situ.

783. Schneiden der unentkalkten Knochen und Zähne. HOPEWELL-SMITH (*Journ. Brit. Dent. Ass. Vol. 11 1890 p. 310; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1890 p. 529) empfiehlt zur Darstellung der Odontoblasten, den Unterkiefer eines Embryos von Hund oder Katze in Müllers Gemisch zu fixiren, dann in Alkohol zu bringen und schliesslich mit dem Gefriermikrotom zu schneiden, dessen Messer durch das dünne halb verkalkte Dentin leicht durchgeht.

S. auch oben § 781 die Methode von Csokor.

784. Entkalken der Knochen und Zähne. Hierüber s. oben § 551. — Schaffer (l. c. p. 176) empfiehlt besonders die Methode von Thoma (§ 553), die von Andeer (§ 566) und die Entkalkung mit dem Gemisch von Flemming oder Hermann. — S. auch oben § 56 (HOEHL).

785. Schneiden der entkalkten Knochen und Zähne. SCHAFFER (l. c. p. 179) räth die Einbettung in Celloidin an, da die Erwärmung in Paraffin für die Knochensubstanz schädlich sei. Offenbar gilt dies aber nicht von den mit Chromsäure-Gemischen entkalkten und zugleich gehärteten Objekten. Im Uebrigen s. auch unten § 786 ff.

786. Methoden zur Untersuchung der Knochenzellen. Nach SCHAFFER (l. c. p. 181) fixirt man dünne Knochenplättchen mit Flemmingschem oder ähnlichen Gemischen, z. B. Pikrinsublimat, die zugleich entkalken, und zerzupft sie dann mit Nadeln oder schneidet und färbt sie.

VIVANTE (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 9. Bd. 1892 p. 398; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 351) legt 3—4 mm dicke Stücke des Stirnknochens von 4—6 Monate alten Kälbern auf 8 Tage in Müllers Gemisch und behandelt sie dann mit Höllenstein nach Golgi weiter. Nach der Versilberung legt er sie zum Entkalken auf 20 Tage in Ebners Gemisch (oben § 556), wäscht sie gut mit Wasser und Jod aus und bettet sie in Paraffin ein. Oder (p. 400) er fixirt sie 5—6 Tage lang in Flemmings Gemisch, entkalkt sie nach Ebner, wäscht sie, bringt sie in Paraffin, färbt die Schnitte eine Stunde lang in einer 1/5 %igen Lösung von Chinolinblau (oben § 334), wäscht sie in 50 %igem Alkohol, dann in Wasser aus, trocknet sie bei 40° C. und bringt sie durch Bergamottöl in Dammar. (Ausführliche Kritik dieser Methoden s. bei SCHAFFER, l. c.)

S. auch SCHMORL (Verh. Ges. D. Naturf. Aerzte 71. Vers. 2. Theil 2. Hälfte 1900 p. 21): Darstellung der Knochenkörperchen und ihrer Ausläufer durch Thionin und Pikrinsäure oder Thionin und Phosphorwolfram (oder -molybdän)säure.

787. Methoden zur Untersuchung der Kanäle in Knochen und Zähnen. Man füllt die Kanäle entweder mit Luft oder mit Farbstoffen oder endlich färbt ihre Wände. Hierher gehört das Einschmelzen in harten Kanadabalsam, das nach Schaffer (l. c. p. 185) bereits 1849 von Krukenberg angegeben worden ist. Ferner die Methode von Flemming (s. unten), sowie die von White, Ruprecht und Zimmermann (oben § 781) und noch manche andere (s. hierüber Schaffer). — S. auch Spuler (Anat. Anz. 14. Bd. 1898 p. 289) und Schaffer (ibid. p. 429).

Flemming (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 47) macht aus freier Hand Schnitte durch entkalkte Knochen, legt sie auf dem Objektträger in einen Wassertropfen, trocknet sie mit Löschpapier ab, deckt einen anderen Objektträger darauf und bringt sie so auf $^1/_2$ Stunde in Alkohol, damit sie sich nicht rollen können, später in absoluten Alkohol, endlich wieder auf einen Objektträger und, mit Löschpapier und einem schweren Glase bedeckt, 1 Tag lang zum Trocknen an die Luft oder in die Wärme. Sind sie auf diese Weise flach getrocknet, so schafft er sie auf einen Objektträger mit einem flach ausgebreiteten Tropfen Kanadabalsam, legt ein ähnlich präparirtes Deckglas auf, erwärmt das Präparat etwas und drückt das Deckglas fest an. Die Lakunen etc. sind dann eben so gut mit Luft gefüllt wie auf Schliffen. (Schaffer, l. c., findet aber die Form der Lakunen und Kanälchen etwas verändert.)

788. Methoden zur Untersuchung der Grundsubstanz von Knochen und Zähnen. Schaffer (l. c. p. 191 ff.) erörtert ausführlich a) die Grenzscheiden, deren Isolirung durch künstliche Verdauung, Kochen in Wasser oder Essigsäure, Maceriren in Kalilauge etc. möglich ist; b) die fibrilläre Struktur (Glühen auf dem Platinblech etc.); c) die Kittsubstanz; d) die lamelläre Struktur (Maceriren, Kochen, Imprägniren mit Höllenstein etc.); e) die Sharpeyschen Fasern: Entkalkung eines polirten Schliffes mit $^1/_2$—1$^0/_0$iger Salzsäure (Ranvier), Färbung nach Kölliker (s. unten) etc.; f) die elastischen Fasern (die hierfür gebräuchlichen Methoden).

Kölliker (Zeit. Wiss. Z. 44. Bd. 1886 p. 662) behandelt zur Demonstration der Sharpeyschen Fasern die Schnitte so lange mit konzentr. Essigsäure, bis sie durchsichtig sind, bringt sie dann auf $^1/_4$—1 Minute in eine konzentrirte Lösung von Indigkarmin, wäscht sie mit Wasser und schliesst sie in Glycerin oder Balsam ein. In gelungenen Präparaten seien die Fasern roth, die Grundsubstanz blau.

789. Methoden zur Untersuchung des Knochenmarks. Im Wesentlichen wird das Knochenmark wie das Blut untersucht; es lassen sich auch Trockenpräparate davon anfertigen. S. § 792 ff.

790. Färbung des Knorpels und entkalkten Knochens. Die gesammte Technik hierzu hat SCHAFFER (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 1) ausführlich behandelt. Unter anderen Methoden empfiehlt er (p. 17) eine Modifikation der von BOUMA (Centralbl. Med. Wiss. 21. Jahrg. 1883 p. 866): die Schnitte von dem mit Salpetersäure (Chromsäure ist nicht so gut) entkalkten Knochen färbt man $^1/_2$—1 Stunde lang mit einer $^1/_{20}$ $^0/_0$igen wässerigen Lösung von Safranin, wäscht sie aus, legt sie auf 2—3 Stunden in eine $^1/_{10}$ $^0/_0$ige Lösung von Sublimat und bringt sie entweder in Glycerin oder (durch Bergamott- oder Nelkenöl) in Balsam. Knorpel orange, Knochen ungefärbt (oder nach Chromsäure grün), Mark roth.

BAYERL (Arch. Mikr. Anat. 23. Bd. 1884 p. 35) entkalkt verkalkten Knorpel wie oben § 557 angegeben, bringt ihn in Paraffin, färbt die Schnitte mit Borax- und Indigkarmin (oben § 345) und schliesst sie in Balsam ein. — FLESCH (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 351) rühmt diese Methode besonders zum Studium der Zahnentwicklung.

ZSCHOKKE (ibid. 10. Bd. 1893 p. 381) empfiehlt Benzoazurin in wässeriger Lösung für ossifizirenden Knorpel. Ueber die Methode von Baumgarten s. oben § 335. — S. auch § 800.

MÖRNER (Skand. Arch. Phys. 1. Bd. 1889 p. 216; Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1900 p. 508) gibt einige Färbungen, besonders zu mikrochemischen Reaktionen, für Trachealknorpel an. Eine Kritik dieser Methoden liefert WOLTERS (Arch. Mikr. Anat. 37. Bd. 1891 p. 492): s. auch TERRAZAS in: Riv. Trimestr. Micr. Madrid Vol. 1 1896 p. 113.

VAN WIJHE (Tijd. Nederl. Dierk. Ver. (2) Deel 6 1900 Versl. p. 6) färbt die mit einem Gemisch von Formol und Sublimatlösung fixirten Embryonen von *Lepus* in toto mit Safranin (1 $^0/_0$ige Lösung in Alkohol von 70 $^0/_0$) einige Tage lang und wäscht sie eine Woche lang mit 75 $^0/_0$igem Alkohol aus; dann durch Xylol in Balsam: nur der Knorpel ist gefärbt.

791. Andere Methoden für Knochen oder Knorpel. Nach EWALD (Zeit. Biol. 34. Bd. 1897 p. 246) füllen sich in den Knochenstrahlen der Flossen kleinerer Fische sämmtliche Lakunen mit Luft, wenn man die Strahlen direkt in absoluten Alkohol bringt; die Luft entweicht auch nicht beim Ueberführen durch Nelkenöl in Balsam.

SPULER (Sitzungsb. Physik. Med. Soc. Erlangen 27. Heft 1896 p. 93) konservirt die nur 3—4 mm dicken Scheiben von elastischem Knorpel in Pikrinosmiumplatinchlorid nach vom Rath (oben § 98) oder in „$^1/_2$ $^0/_0$iger Sublimatlösung unter Zusatz von 0,2 $^0/_0$ Eisessig“, bringt sie ganz langsam durch Alkohol in Chloroform, eben so sorgfältig in Paraffin und färbt die aufgeklebten Schnitte entweder mit seinem Hämalaun (oben § 238) oder mit Safranin oder Orceïn:

mit letzteren beiden entweder nur 1 oder 4—10 Tage lang. — Ueber die Färbung des Knorpels mit Orceïn s. auch Moll (Centralbl. Phys. 13. Bd. 1899 p. 225).

Fusari (Arch. Ital. Biol. Tome 25 1896 p. 200; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 488) legt die Schnitte durch frischen Knorpel auf 24 Stunden in 1%ige Lösung von Höllenstein, dann in Wasser, entwässert sie und setzt sie in Balsam dem Lichte aus. — S. auch Schiefferdecker, Gewebelehre p. 331.

Lepkowski (Anat. Hefte 1. Abth. 8. Bd. 1897 p. 568) injizirt zum Studium der Gefässe in den Zähnen zunächst lösliches Berlinerblau (in Wasser und Glycerin gelöst), härtet dann den Zahn sammt seinem Stück Kiefer 1—2 Tage lang in 50%igem Formol, entkalkt ihn in 10%iger Salpetersäure (8—14 Tage lang, mehrere Male zu wechseln) und bettet ihn nach gutem Auswaschen zum Schneiden in Celloidin ein.

Ueber die Vergoldung der Zähne nach Underwood s. oben p. 238, nach Lepkowski s. Anat. Anzeiger 7. Jahrg. 1892 p. 274.

Ueber die Untersuchung des Knochengewebes in polarisirtem Licht und über die Methoden zur Untersuchung des Wachsthums der Knochen s. Schaffer (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 202 ff.), über den Nachweis von Kalk oben p. 331.

Retterer (Journ. Anat. Phys. Paris 36. Année 1900 p. 508) fixirt zum Studium der Verknöcherung den Knorpel ausser mit den Gemischen von Zenker und Flemming oder mit Sublimat auch mit einem Gemisch von 66 Vol. 3%iger Chromsäurelösung, 33 Vol. Formol und 8 Vol. Essigsäure, oder von 50 Vol. 5%iger Lösung von Platinchlorid, 50 Vol. Formol und 3 Vol. Essigsäure. Nach 6—12 Stunden gründliches Waschen mit Wasser.

Blut.

792. Literatur. Die Technik zur Untersuchung des Blutes ist äusserst verwickelt; man sehe z. B. das umfangreiche Buch von Hayem (Du sang et de ses altérations anatomiques, Paris 1889 1035 pgg.; ausführliches Referat in: Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 330), ferner die zahlreichen Schriften von Löwit u. s. w. u. s. w. (s. hierüber Literarisches bei Giglio-Tos in: Mem. Accad. Torino (2) Tomo 47 1897 p. 37), sowie Ehrlich & Lazarus (Die Anämie. 1. Abth. Norm. u. path. Hist. des Blutes. Wien 1898) und *Coles (The Blood: how to examine etc. London 1898).

Ueber Blut und Lymphorgane der Invertebraten s. Cuénot (Arch. Anat. Micr. Paris Tome 1 1897 p. 153).

793. Ueber die **Blutparasiten,** soweit sie zu den Protozoen gehören, s. unten § 878 u. 879.

794. Ueber **Normalsalzlösungen** zur Untersuchung frischen Blutes s. oben § 384 und 385.

Duboscq (Arch. Z. Expér. (3) Tome 6 1899 p. 483) untersucht das frische Blut der Chilopoden in Oel.

795. Fixiren und Konserviren. Die Methode des Eintrocknens eines Bluttropfens über der Flamme deformirt die Blutkörperchen meist so sehr, dass man sie möglichst wenig anwenden sollte.

Die Methode zur Anfertigung des Trockenpräparates von Menschenblut stammt von Ehrlich (1880) her. Neuerdings geben Ehrlich & Lazarus (citirt in § 792) p. 20 ganz genaue Vorschriften. Danach sollen die Deckgläser höchstens 10 μ dick, sehr biegsam, ganz eben und frei von Schlieren sein; auch müssen sie erst in Aether, dann in Alkohol gelegen haben und jedesmal sauber abgeputzt worden sein. Sie werden dann zur Aufnahme des Blutes nicht mit den Fingern, sondern von jedem Paar das untere mit einer besonderen Schieberpinzette, das obere mit einer einfachen, glatten Pinzette (beide Arten bei Klönne & Müller in Berlin zu haben) gefasst; mit dem oberen hebt man den Bluttropfen aus der Wunde und lässt es dann leicht auf das untere Deckglas fallen, sodass der Tropfen sich zwischen beiden capillär ausbreitet. Nun zieht man das obere Glas an den Kanten, ohne zu drücken oder zu heben, vom unteren vorsichtig ab und hat dann entweder nur auf letzterem oder auf beiden eine ganz gleichmässige Schicht Blut. In 10—30 Sekunden ist dieses lufttrocken und kann zwischen Filtrirpapier aufbewahrt werden.

Zum Fixiren des trocknen Blutes dient entweder trockne Hitze von etwa 110° (auf dem Deckel eines Kessels, worin Toluol siedet) in der Regel ½—2 Minuten lang, oder absoluter Alkohol 5 Minuten lang, oder Formol in 1 %iger alkoholischer Lösung (nach Benario) 1 Minute lang oder Alkohol und Aether zu gleichen Theilen (nach Nikiforoff) 2 Stunden lang.

Im „technisch zureichenden" Trockenpräparate haben nach E. & L. die Erythrocyten ihre Form und Grösse bewahrt. Uebrigens ist die Methode von Ehrlich nicht für morphologische Zwecke erdacht worden (s. auch Ullmann in: Arch. Path. Anat. 154. Bd. 1898 p. 575).

Gulland (*Brit. Med. Journ. No. 1899 1897 p. 652; Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 62) bestreicht Deckgläser mit einer dünnen Schicht Blut, bringt sie auf 3—4 Minuten in ein Gemisch von 25 ccm Aether, 25 ccm gesättigter Lösung von Eosin in absolutem Alkohol und 5 Tropfen einer Lösung von 1 g Sublimat in 5 ccm absolutem Alkohol, wäscht sie mit Wasser, färbt sie 1 Minute lang in konzentrirter wässeriger Lösung von Methylenblau, wäscht sie wieder, entwässert sie und bringt sie durch Xylol in Xylolbalsam.

Die meisten Autoren betrachten die Osmiumsäure als bei weitem das getreueste Fixirmittel. Man mischt 1 oder 2 Tropfen Blut mit 5 ccm einer 1—2 %igen Osmiumsäure, lässt es darin 1—24 Stunden

und kann es dann in Lösung von Kaliumacetat aufbewahren (Flesch in: Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 83). Die genaue Stärke der Osmiumsäure muss man übrigens je nach der Art des Blutes ausprobiren; Biondi (Arch. Mikr. Anat. 31. Bd. 1887 p. 106) empfiehlt die 2 %ige. — Griesbach (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 328) kombinirt damit die Färbung (mit Methylgrün oder Methylviolett, Kristallviolett, Safranin, Eosin, Säurefuchsin, Rhodamin oder Jodjodkalium). — Rossi (ibid. 6. Bd. 1890 p. 475) nimmt gleiche Theile von 1%iger Osmiumsäure, Wasser und einer starken Lösung von Methylgrün; für Dauerpräparate gibt er langsam Glycerin hinzu. S. übrigens auch § 796.

Arnold (Arch. Path. Anat. 148. Bd. 1897 p. 479) lässt das Blut von *Rana* direkt in 1 %ige Osmiumsäure hineintropfen, ersetzt nach 24 Stunden die Säure durch immer stärkeren Alkohol, durch Aether-Alkohol, zuletzt durch Celloidin und giesst das Ganze in dünner Schicht auf eine Glasplatte. Die so erhaltenen feinen Membranen löst man mit Wasser vom Glase ab und färbt sie nach Belieben. — Ewald (Zeit. Biol. 34. Bd. 1897 p. 257) nimmt auf je 3—4 Tropfen Blut von Amphibien und Reptilien 10 ccm einer Lösung von 1/2 % Osmiumsäure und 1/2 % Kochsalz (für Säugethiere etwas mehr Salz: 0,6 bis 0,7 %), hebert nach 24 Stunden mit dem „Capillarheber" (oben p. 4) die Flüssigkeit ab und ersetzt sie durch Wasser, Alaunkarmin etc., schliesslich durch 50 %igen Alkohol.

Duboscq (Arch. Z. Expér. (3) Tome 6 1899 p. 483) fixirt, färbt und untersucht das Blut der Chilopoden, indem er gleiche Theile davon und von seinem Gemisch (oben p. 54) nimmt. Oder er fixirt es mit Jodjodkalium und färbt es unter dem Deckglase mit Säurefuchsin. Das Trocknen des Blutes ergibt keine guten Resultate.

Neuerdings wird auch Formaldehyd zum Fixiren verwandt, so von Gulland (Zeit. Wiss. Mikr. 17. Bd. 1900 p. 222) ein Gemisch von 1 Th. Formol und 9 Th. Alkohol, und von Deetjen (*Münch. Med. Wochenschr. 1897 No. 43; Centralbl. Bakt. 1. Abth. 23. Bd. 1898 p. 615) Formoldämpfe. — S. auch oben p. 408 das Gemisch von Benario sowie Marcano (*Arch. Méd. Expér. Tome 11 1899 p. 434; Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd. 1899 p. 364) und Wermel (ibid. p. 50: Fixirung und Färbung zugleich, indem die Färblösungen mit Formol gemischt werden).

Die Sublimat-Gemische von Pacini (oben § 401) hielt man früher für gut. Hayem (l. c.; Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 335) verwendet Sublimat 1, Kochsalz 2, Natriumsulfat 10 und Wasser 400. Hiervon setzt er zum Blut im Verhältniss von 100:1; auch Eosin kann man hinzufügen. — Nach Mosso (Atti Accad. Lincei Rend. (4) Vol. 4 Sem. 1 1888 p. 431) ist aber die Menge des Sublimats zu gering. — Löwit (Sitzungsb. Akad. Wien 95. Bd. 3. Abth. 1887 p. 144; Zeit. Wiss. Mikr.

6. Bd. 1889 p. 75) nimmt konzentrirte Sublimatlösung 5 ccm, Natriumsulfat 5 g, Kochsalz 2 g und Wasser 300 ccm.

Natürlich kann man auch andere gute Fixirmittel, z. B. Flemmings oder Hermanns Gemisch, für das Blut verwenden.

Muir (Journ. Anat. Phys. London Vol. 26 1892 p. 393) fixirt die Deckglaspräparate, bevor sie trocken sind, durch Auflegen (mit dem Blute nach unten) auf etwa 50° C. warme konzentr. Sublimatlösung; nach ½ Stunde wäscht er sie in Normalsalzwasser ab und bringt sie gradatim in starken Alkohol (in den schwächeren ist Kochsalz gelöst). Besonders die Mitosen sollen gut erhalten sein.

Lavdowsky beschreibt ausführlich (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 4) seine Fixirung mit 2%iger Jodsäure und seine Färbung mit Neu-Viktoriagrün, Methylviolett 6 B oder Gentianaviolett; er hat damit auch da Kerne gefunden, wo man sie sonst allgemein vermisst.

796. Färben der Blutzellen (s. auch § 795). Frisches Blut behandelt man nach Bizzozero & Torre (*Arch. Sc. Med. Torino Vol. 4 1880 p. 390) wie folgt: man verdünnt einen Tropfen Blut mit Normalsalzwasser (0.75%), worin eine Spur Methylviolett gelöst ist; dieses Gemisch kann auch zur Untersuchung von Knochenmark und Milz dienen. Konservirtes Blut kann man mit vielen von den gebräuchlichen Mitteln färben. Eosin färbt in den Blutkörperchen alle Theile, die Hämoglobin enthalten, rosenroth; Wissozky (Arch. Mikr. Anat. 12. Bd. 1876 p. 479) nimmt dazu Eosin und Alaun nach Fischer (s. oben p. 218) und färbt die Kerne mit „konzentrirter Hämatoxylinlösung“ nach. — Moore (*Microscope 1882 p. 73; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1882 p. 714) färbt 3 Minuten lang mit einer ähnlichen Lösung (aber ohne Alaun), wäscht aus und dann 2 Minuten lang mit einer 1%igen wässerigen Lösung von Methylgrün. — Ueber Chenzinskis Gemisch s. oben § 326.

Mehrere Methoden zum Färben der Erythrocyten in den mit Alkohol gehärteten Geweben (es handelt sich um Blutungen in der Haut) gibt Unna (Monatsh. Prakt. Derm. 21. Bd. 1895 p. 1; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 234) an.

Leclerq (*Bull. Soc. Belg. Micr. 16. Année 1890 p. 61; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1890 p. 675) nimmt Fuchsin und nachher Malachitgrün, oder Congoroth und nachher Gentianaviolett und Eosin. — Dekhuyzen (Verh. Anat. Ges. 6. Vers. 1892 p. 90) verwendet Methylenblau und Fuchsin, Giglio-Tos (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 359) Methylenblau BX.

Natürlich sind die Gemische von Ehrlich (oben § 316, 317 u. 333) für manche hämatologische Untersuchungen höchst werthvoll. Löwit

(Beitr. Path. Anat. 10. Bd. 1891 p. 278; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 371) färbt das in Sublimat konservirte Blut (von *Astacus!*) 1—2 Minuten lang mit dem konzentrirten Gemisch von Ehrlich-Biondi und untersucht es in Wasser oder Glycerin. — KNOLL (Sitzungsb. Akad. Wien 102. Bd. 3. Abth. 1894 p. 441; 105. Bd. 3. Abth. 1896 p. 35) fixirt das Blut einige Minuten lang mit 2%iger Osmiumsäure, lässt es auf einem Deckglase langsam trocknen, färbt es nach Ehrlich-Biondi und untersucht es in halbkonzentrirtem Glycerin. (Die Methode gilt auch für das Blut von Wirbellosen.)

Weiteres über die Körnchen in den Leucocyten etc. s. in der eben citirten Arbeit von LÖWIT, ferner bei EHRLICH, Methodol. Beitr. Phys. Leucocyten (Zeit. Klin. Med. 1. Bd. 1880 p. 558; Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 382), bei LÖWIT (Anat. Anzeiger 6. Jahrg. 1891 p. 344; Arch. Mikr. Anat. 38. Bd. 1891 p. 524), bei GULLAND (Journ. Phys. Cambridge Vol. 19 1896 p. 385); s. auch HIRSCHFELD (Arch. Path. Anat. 149. Bd. 1897 p. 22). Einzelheiten über Ehrlichs Methode der Deckglas-Präparate bei REINBACH (Arch. Klin. Chir. 46. Bd. 1893 p. 486; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 258). Die Methode von FOÀ s. oben p. 194. — MÜLLER (Sitzungsb. Akad. Wien 98. Bd. 3. Abth. 1890 p. 219; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 365) gibt u. A. als neue Methode die Vergoldung von Blut auf dem Deckglase nach Ranvier. — S. auch SAXER (Anat. Hefte 1. Abth. 6. Bd. 1896 p. 347), RUBINSTEIN (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1898 p. 456), ZIELINA (ibid. p. 463), GIGLIO-TOS (ibid. p. 166: Neutralroth) und PRINCE (ibid. 16. Bd. 1900 p. 468: Toluidinblau, Säurefuchsin und Eosin).

797. Färben des Fibrins. WEIGERT (*Fortschr. Med. 5. Bd. 1887 p. 228; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 512) färbt die Schnitte von Material aus Alkohol mit einer konzentrirten Lösung von Gentiana- oder Methylviolett in Anilinwasser (oben p. 193), trocknet sie auf einem Objektträger mit Filtrirpapier ab und giesst Lugols Gemisch (§ 50) darauf. Nach genügender Einwirkung trocknet er sie wieder ab und gibt einen Tropfen Anilin darauf, der, sobald er sich dunkel färbt, 1 oder 2mal erneuert wird. Sind die Schnitte so zugleich differenzirt und entwässert, so wird das Anilin sorgfältig durch Xylol verdrängt und zuletzt Balsam und ein Deckglas darauf gelegt. — S. die Modifikationen dieser Methode von KROMAYER (oben § 647) und BENECKE (§ 769).

UNNA (Monatsh. Prakt. Derm. 20. Bd. 1895 p. 140; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 229) empfiehlt ausser einer Modifikation der obigen Methode eine andere mit polychromem Methylenblau und Jodjodkalium, sowie eine mit Fuchsin und Tannin.

WOLFF (Zeit. Wiss. Mikr. 15. Bd. 1899 p. 310) nimmt ein Gemisch von 1 Theil konzentr. alkoholischer Lösung von Gentianaviolett und 2 Th. konzentr. wässeriger Lösung von Lithiumkarbonat.

S. auch KOCKEL (Verh. Ges. D. Naturf. Aerzte 71. Vers. 2. Theil 2. Hälfte 1900 p. 25; komplizirte Färbung der Schnitte mit Chromsäure, Hämatoxylin, Alaun, Ferricyankalium etc.).

798. Blutplättchen. KEMP (Stud. Biol. Lab. J. Hopkins Univ. Vol. 3 1886 p. 293) weist sie dadurch nach, dass er einen grossen Tropfen Blut auf einen Objektträger bringt und rasch etwas Normalsalzwasser (0.75 %) darüber fliessen lässt. Die Blutplättchen bleiben am Glase kleben. Will man sie fixirt untersuchen, so bringt man auf den Finger, bevor man ihn ansticht, einen Tropfen Lösung von Osmiumsäure. — Zur Färbung nimmt BIZZOZERO (Arch. Path. Anat. 90. Bd. 1882 p. 278; Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 389) eine $^1/_{50}$ %ige Lösung von Methylviolett oder eine $^1/_{30}$ %ige von Gentianaviolett in Normalsalzwasser.

EHRLICH & LAZARUS (Anämie 1. Abth. Wien 1898 p. 132) empfehlen ein Verfahren von Rosin: die Trockenpräparate werden 20 Minuten lang mit Dämpfen von Osmiumsäure fixirt und in konzentr. wässeriger Lösung von Methylenblau gefärbt. Ferner lassen sich die Plättchen als stark alkalisch durch Erythrosin nachweisen: aus einer wässerigen Lösung wird die Farbsäure durch eine Säure ausgefällt und durch Schütteln in Chloroform oder Chloroform-Toluol übergeführt; in dieser färben sie sich stark roth; man wäscht das Präparat mit Chloroform und schliesst es in Balsam ein.

RABL (Wiener Klin. Wochenschr. 1896 N. 46) fixirt die lufttrocknen Deckglaspräparate $^1/_4$-$^1/_2$ Stunde mit wässeriger Sublimatlösung, wäscht sie mit Wasser aus und tingirt sie mit Eisenhämatoxylin: Plättchen und Leucocyten gefärbt, Erythrocyten nicht.

BIZZOZEROS Methoden zum Zählen der Plättchen und zum Studium ihrer Regeneration s. in: *Internation. Beitr. Wiss. Med. 1. Bd. 1891 p. 459; Arch. Ital. Biol. Tome 16 1892 p. 375; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 229. — Die Anwendung der künstlichen Verdauung auf Blut s. bei LILIENFELD (Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1892 p. 115; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 363); Methoden zur Gewinnung grosser Mengen Blutplättchen bei DRUEBIN (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 493). — S. auch BRODIE & RUSSEL (Journ. Phys. Cambridge Vol. 21 1897 p. 390; Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 392) und DETERMANN (*D. Arch. Klin. Med. 61. Bd. 1898 p. 365; Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd. 1899 p. 86).

799. Schnitte durch Blut. BIONDI (Arch. Mikr. Anat. 31. Bd. 1888 p. 103) veröffentlicht eine komplizirte Methode zum Schneiden der Blutkörperchen. Er bettet das Blut in Agar-Agar ein (s. oben p. 104); SCHIEFFERDECKER (Gewebelehre p. 389) empfiehlt dazu Celloidin. — S. auch oben p. 409 (ARNOLD).

Drüsen.

800. Schleimdrüsen. Hoyer (Arch. Mikr. Anat. 36. Bd. 1890 p. 310) berichtet in einer ausführlichen Arbeit, die auch die ältere Literatur über die Schleimdrüsen und Becherzellen namentlich der Wirbelthiere umfasst, über seine Versuche zur Färbung des thierischen Schleimes („Mucins"). Er verwendet von den Theerfarbstoffen hauptsächlich Thionin, das in der Regel die Gewebe blau, den Schleim roth tingirt, macht aber mehrere andere Farbstoffe namhaft, die ebenfalls metachromatisch färben, z. B. Toluidinblau. Methylenblau färbt den Schleim sehr stark und eignet sich daher gut zu seiner Entdeckung, wenn er nur in Spuren zugegen ist.

Die Objekte fixirt Hoyer meist 2—8 Stunden lang mit 5%iger Lösung von Sublimat, bettet sie in Paraffin ein und färbt die Schnitte 5—15 Minuten lang in einer sehr schwachen Lösung des Farbstoffs (2 Tropfen der konzentrirten Lösung auf 5 ccm Wasser).

Hyalinknorpel, Whartonsche Sulze und die Ehrlichschen Mastzellen färben sich mit den basischen Theerfarbstoffen genau so wie Schleim.

S. ferner über Schleimfärbung Sussdorf (*D. Zeit. Thiermed. 14. Bd. p. 345; Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 205), Bizzozero (Arch. Mikr. Anat. 33. Bd. 1889 p. 240; 40. Bd. 1892 p. 331 etc.; Atti Accad. Torino Vol. 24 1889 p. 130; Vol. 27 1892 p. 19 etc.; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 61; 9. Bd. 1892 p. 219) und Unna (Monatsh. Prakt. Derm. 20. Bd. 1895 p. 365; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 42): Bizzozero verwendet Safranin, Unna hauptsächlich sein polychromes Methylenblau (oben § 774), zu dessen Differenzirung und Fixirung in den Schnitten er genaue Vorschriften gibt. — S. auch oben § 291.

Mayer bespricht in einer Schrift über das Färben thierischen Schleimes (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 303; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 38) nicht nur die gebräuchlichen Theerfarbstoffe: Methylgrün, Jodgrün, Methylenblau, Methylviolett, Thionin, Toluidinblau, Bismarckbraun und Safranin, sowie die Hämateïnthonerde-Gemische, sondern gibt auch die Formeln zur Bereitung von 2 Gemischen, die ausschliesslich den Schleim färben (Mucikarmin und Muchämateïn, § 802 u. 803). Ein Gemisch von relativ viel Methylviolett und wenig Methylenblau in wässeriger Lösung mit etwas Essigsäure färbt die Kerne blau, den Schleim roth (p. 314); auch Unnas polychromes Methylenblau (oben § 774) tingirt sehr gut. Die rothe Färbung des Schleimes mit Thionin ist wenig haltbar, etwas besser die mit

Toluidinblau (p. 315). Sehr scharf färbt sich der Schleim, allerdings schmutzig violett, aber auch in Balsam haltbar, wenn man eine konzentr. Lösung von Safranin in 30%igem Alkohol, mit Salzsäure schwach angesäuert, auf die Schnitte über Nacht einwirken lässt und mit Alkohol abspült (p. 317). Mit Lösungen von Hämateïnthonerde färbt sich, wenn sie freie Säure oder relativ viel Alaun enthalten (z. B. Mayers Hämalaun), der Schleim meist nicht, wohl aber, wenn sie mit relativ viel Hämateïn und wenig Alaun bereitet sind, oder wenn man sie mit Wasser verdünnt oder die Säure des Alauns vorsichtig (mit Brunnenwasser oder Kaliumacetat) abstumpft (p. 305). Jedenfalls verhalten sich die Schleime je nach ihrer Provenienz verschieden gegen die Färbmittel, wie es ja auch mehr als nur eine Art Mucin gibt; andererseits werden vom Thionin, das Hoyer (s. oben) als Spezifikum für die Mucinfärbung anführt, vom Safranin etc. auch Substanzen gefärbt, die bestimmt kein Mucin enthalten, z. B. die Corpora amylacea der Pathologen, Eiweiss, Gummiarabicum etc. (p. 321 ff.).

Kultschitzky (Arch. Mikr. Anat. 49. Bd. 1897 p. 8) fixirt die Gewebe in seinem Gemisch (oben § 59) und färbt die Paraffinschnitte entweder mit Safranin (gelöst in 2%iger Essigsäure) oder in Neutralroth (2—3 Tage lang, dann mit Alkohol auswaschen).

Nach Schaffer (Sitzungsb. Akad. Wien 106. Bd. 3. Abth. 1898 p. 391) färbt Orceïn in saurer Lösung zwar den Schleim nur wenig, stark dagegen das Chondromucoid. Die Vorbehandlung soll unter Umständen die Färbbarkeit des Schleimes aufheben, z. B. bleiben Schleimzellen, in Eisessigsublimat fixirt, sogar in Delafields Hämatoxylin ungefärbt.

801. Metachromatische Färbung des Schleimes. Nach Mayer (l. c. p. 328) ist die Gelbfärbung des Schleimes mit Safranin, die Rothfärbung mit Thionin, Methylviolett etc. wohl rein optischer Natur; dagegen beruht die Metachromasie beim Jodgrün, Methylgrün, dem polychromen Methylenblau und Safranin (violett) auf Verunreinigungen mit anderen Farbstoffen.

Fischer (Fixirung etc. p. 145) meint, man sehe es dem Thionin „schon in der Lösung an, dass es ein Gemisch ist, und alle Farbstoffe mit violetten Tönen können rothe und blaue Verunreinigungen enthalten, die zu metachromatischen Färbungen führen müssen“. Dies trifft indessen nach meinen (Mayer) Erfahrungen bei der Färbung des Schleimes nicht zu.

802. Mucikarmin nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 317). Karmin 1 g, Chloraluminium 0,5 g und destill. Wasser 2 ccm werden über einer kleinen Flamme etwa 2 Minuten lang erhitzt, bis das Gemisch ganz dunkel geworden ist. Dazu setzt man nach und

nach 100 ccm Alkohol von 50 % und filtrirt 24 Stunden später. Diese Stammlösung gebraucht man nur ausnahmsweise entweder direkt oder nach Verdünnung auf $^1/_5$—$^1/_{10}$ mit Alkohol von 50 oder 70 %, in der Regel aber mit (destillirtem oder) gewöhnlichem Wasser auf $^1/_{10}$ zu Mucikarmin (Gehalt an Karmin $^1/_{1000}$) verdünnt, das in den Schnitten oder dünnen Membranen nur den Schleim färben darf, nicht auch die Kerne, die man übrigens vorher mit Hämalaun färben mag. Die Färbung ist in Balsam oder Vosselers Terpentin unbegrenzt lange haltbar.

Rawitz (Anat. Anz. 15. Bd. 1899 p. 439) hat mit dem Mucikarmin keine guten Resultate erlangt; vielleicht hatte er kein gutes Karmin zur Verfügung. In solchen Fällen nehme man etwas mehr Chloraluminium (bis zur doppelten Menge), denn es kann vorkommen, dass die Lösung nach einiger Zeit gelatinirt, wenn man sich genau an das obige geringe Quantum (0,5 g) hält. Allerdings färbt sich der Schleim um so langsamer und weniger stark, je mehr Chloraluminium man genommen hat. — S. auch § 804.

803. Muchämateïn nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 307). Man verreibt 0,2 g Hämateïn mit einigen Tropfen Glycerin und gibt dazu Chloraluminium 0,1 g, Glycerin 40 ccm und destill. Wasser 60 ccm. Filtriren kaum nöthig. — Alkoholische Lösung (p. 308): Hämateïn 0,2 g, Chloraluminium 0,1 g, Alkohol (von 70 %) 100 ccm. Salpetersäure 1—2 Tropfen. Beide Lösungen dienen zur Färbung des Schleimes in Schnitten oder dünnen Membranen; namentlich die wässerige färbt ihn gewöhnlich ungemein rasch, ohne sich um die übrigen Bestandtheile der Zellen zu kümmern. Die Kerne mag man vorher mit Parakarmin färben.

Wenn der Schleim stark zum Quellen neigt, wie z. B. in der Haut von Fischen, so empfiehlt sich seine Färbung mit dem alkoholischen Mucikarmin oder Muchämateïn, da sonst namentlich auf den Schnitten die Bilder leicht unklar werden. Man muss dann auch beim Fixiren wässerige Gemische möglichst vermeiden.

Harris (Journ. Appl. Micr. 1900 p. 779) fertigt das Muchämateïn mit Hämatoxylin an, indem er dieses durch Kochen mit Quecksilberoxyd oxydirt.

804. Mucikarminsäure nach Rawitz (Anat. Anz. 15. Bd. 1899 p. 439): 1 g Karminsäure, 2 g Chloraluminium und 100 ccm Alkohol von 50 % werden in einer Schale zur Trockne abgedampft, und der Rückstand wird von Neuem in derselben Menge Alkohol von 50 % gelöst. Verwendung wie beim Mucikarmin (§ 802).

Nach Mayer (Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd. 1899 p. 214) wird durch das Abdampfen der Lösung das Chloraluminium weniger sauer. Wenn man also von vorneherein etwas Natriumkarbonat oder Thonerdehydrat hinzufügt, so wird die Bereitung der Mucikarminsäure einfacher. — Ein Gemisch von Karminsäure 1,

Natriumbikarbonat 1, Chloraluminium 2, Alkohol 200 hat sich seit fast 2 Jahren unverändert gehalten und färbt den Schleim präcis, allerdings blauviolett.

805. Färbung des Schleims mit Eisen. Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 326) lässt Schnitte, mit einer schwachen Lösung von Eisenacetat in dünner Schicht bedeckt, einige Tage lang in einer feuchten Kammer liegen; der Schleim hat dann meist so viel Eisen aufgenommen, dass er gelb geworden ist, jedenfalls aber mit Gerbsäure schwarz oder mit Ferrocyankalium und Salzsäure blau wird. — List (ibid. p. 490) erhält eine scharfe Färbung des Schleimes, indem er die Schnitte mit einer Lösung von Eisenchlorid, die mit Salzsäure angesäuert ist, $^1/_2$ Stunde lang behandelt und dann mit Ferrocyankalium bläut. (S. auch § 642.)

806. Die Vertheilung der Schleimdrüsen in der Haut von Nacktschnecken und Anneliden macht Racovitza (Arch. Z. Expér. (3) Tome 2 1894 Notes p. 8: Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 224) dadurch kenntlich, dass er die Thiere mit Essigsäure tödtet, dann in toto mit Methylgrün, das im Gemisch von Ripart & Petit (§ 404) aufgelöst ist, färbt und nach 3—6 Tagen, wenn nur noch die Drüsen tingirt sind, in Glycerin und Riparts Gemisch zu gleichen Theilen untersucht.

807. Becherzellen. Der Schleim in ihnen färbt sich, wie oben § 800 angegeben ist. — S. auch Paneth (Arch. Mikr. Anat. 31. Bd. 1888 p. 113) und List (ibid. 27. Bd. 1886 p. 481), wo die ältere Literatur verzeichnet ist.

Ranvier (C. R. Acad. Sc. Paris Tome 78 1887 p. 145: Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 233) behandelt die Mucosa im Pharynx von *Rana* erst 10—12 Stunden lang mit Dämpfen von Osmiumsäure, dann 3 Minuten lang mit solchen von Ueberruthensäure (RuO_4) und erhält so das Mucigen in den Becherzellen ganz schwarz.

808. Speicheldrüsen. Solger (Festschrift Gegenbaur Leipzig 2. Bd. 1896 p. 211) härtet die Submaxillaris des Menschen entweder direkt in Alkohol von 96 % oder 3—9 Tage lang in „Formalin (10 procentig)“ oder in Sublimat nach M. Heidenhain etc. Färbung in toto oder der Paraffinschnitte wie gewöhnlich, besonders mit Ehrlichs oder Delafields Hämatoxylingemisch. Auch untersucht er die nach eigener Methode (oben § 180) angefertigten Gefrierschnitte. In Formalin halten sich die Sekretkörner von *Homo* sehr gut (auch nach dem Einlegen der Schnitte in Glycerin), nicht aber die von *Lepus* (p. 229). — Krause (Arch. Mikr. Anat. 45. Bd. 1895 p. 94) färbt die Schnitte entweder mit Eisenhämatoxylin nach Heidenhain oder mit dem Gemisch von

Biondi oder mit Thionin (dieses ist kein spezifisches Reagens auf Schleim). — S. auch Krause (ibid. 49. Bd. 1897 p. 709) und Müller (Zeit. Wiss. Z. 64. Bd. 1898 p. 640).

Grand-Moursel & Tribondeau (C. R. Soc. Biol. Paris Tome 53 1901 p. 187) empfehlen zur Erkennung der Langerhansschen Inseln im Pankreas das Thionin von Nicolle (oben p. 192), das die Inseln fast gar nicht färbe, den Rest des Pankreas hingegen sehr stark.

809. Magendrüsen. Kolster (Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 314) differenzirt in den Magendrüsen die zwei Zellarten dadurch, dass er die Schnitte zuerst mit „Hämatoxylin" überfärbt, dann mit saurem Alkohol (1 % Salzsäure) auszieht, mit alkalischem Alkohol (1 % Ammoniak) wieder bläut — sie dürfen dann nur noch blass blau sein — auswäscht und 1—5 Minuten lang mit schwacher Lösung von Säurefuchsin nachfärbt: Hauptzellen hellblau, Deckzellen roth. Die Methode ist nicht anwendbar auf Material aus Osmiumsäure. — S. auch Oppel, Lehrb. Vergl. Mikr. Anat. Wirbelthiere 1. Der Magen Jena 1896.

Müller (Zeit. Wiss. Z. 64. Bd. 1898 p. 626) fixirt die Magenschleimhaut mit dem Gemisch von Kopsch (oben § 744) 24 Stunden lang, härtet sie 1 bis mehrere Tage in Müllers Gemisch und färbt die Schnitte mit Eisenhämatoxylin und Rubin. Er lobt Golgis Methode zum Studium der Drüsen ungemein.

Ueber den Magen von *Felis* und *Canis* s. Bensley (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 41 1898 p. 366). S. ferner oben § 333 Bensleys Methode zum Färben der Prozymogenkörner in den Oesophagusdrüsen. — Ueber den Muskelmagen der Vögel s. Bauer (Arch. Mikr. Anat. 57. Bd. 1901 p. 667).

810. Darm. Ueber die Fixirung nach Möller zum Studium der Drüsen s. oben § 109 a.

Maas (Festschr. Kupffer Jena 1899 p. 207) weist das Bindegewebe im Darm von *Myxine* durch Doppelfärbung mit Boraxkarmin (in toto) und Indulin (Schnitte) und noch besser mit Congoroth (in toto: etwa 2 %ige Lösung) und Hämalaun (stark verdünnt für die Schnitte) nach, ebenso durch Säurefuchsin und Pikrinsäure und durch Verdauung mit Pankreassaft, dem etwas Congoroth zugesetzt ist (p. 210), in der Kühle (4—8° C.).

811. Leber. Braus (Denkschr. Med. Nat. Ges. Jena 5. Bd. 1896 p. 307) behandelt die Gallencapillaren nach der schnellen Methode von Golgi, wobei er zum Fixiren der Leber ein Gemisch von 1 Theil Formol und 3 Theilen Müllerschem Gemisch oder $^1/_8$ %iger Chromsäure verwendet. Er schneidet die Stücke hinterher meist aus freier Hand, konstatirt aber durch Behandlung der Schnitte nach Kallius (§ 751) und Färbung mit Hämateïnthonerde, dass die Capillaren weiter

verlaufen, als das Silberchromat sie anzeigt, und hält daher die Resultate der Golgischen Methode, soweit sie negativ sind, für nicht beweiskräftig. Zum Fixiren der Leber dient sonst ein Gemisch von 1 Theil Formol und 3 Theilen wässeriger $7\,^1/_2\,^0/_0$ iger Sublimatlösung, worin die Gewebe fast gar nicht schrumpfen. Färbung meist mit Bordeaux R und Eisenhämatoxylin oder mit Biondis Gemisch.

Holm (Z. Jahrb. Abth. Morph. 10. Bd. 1897 p. 283) fixirt die äusserst fettreiche Leber von *Acanthias* mit einem Gemisch von 5 Theilen Alkohol und 1 Theil Chloroform, bettet sie in Paraffin ein und färbt die Schnitte.

Oppel (Anat. Anzeiger 5. Jahrg. 1890 p. 144; 6. Jahrg. 1891 p. 168) bringt Stücke der in Alkohol konservirten Leber oder Milz auf 24 Stunden in eine Lösung von Kaliummonochromat ($^1/_2$—$10\,^0/_0$), spült sie mit einer sehr schwachen Lösung von Höllenstein ab, legt sie auf 24 Stunden in eine $^3/_4\,^0/_0$ ige Lösung von Höllenstein, wäscht sie aus, entwässert sie und schneidet sie aus freier Hand oder in Paraffin. Die Gitterfasern sind nur nahe der Oberfläche gefärbt, man muss also parallel zu ihr schneiden.

S. auch Ranviers Vorlesungen über die „Membranes muqueuses et le système glandulaire" (Journ. Microgr. Paris Tome 9 u. 10 1885 bis 1886); ferner Krause (Arch. Mikr. Anat. 42. Bd. 1893 p. 57), Miura (Arch. Path. Anat. 97. Bd. 1884 p. 144; Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 243: Vergoldung der Fasernetze), Kupffer (Sitzungsb. Ges. Morph. Phys. München 5. Bd. 1889 p. 82; Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1890 p. 506: Färbung der Gallencapillaren mit Hämatoxylinkupfer nach Heilmeyer, oben § 703, und Anwendung der Golgischen Methode nach Böhm, oben § 743, für dieselben und die Netze) und Kupffer (Arch. Mikr. Anat. 54. Bd. 1899 p. 263: Vergoldung der Sternzellen).

812. Milz. Kultschitzky (Arch. Mikr. Anat. 46. Bd. 1895 p. 675) studirt die Muskulatur an Schnitten (von Material aus Müllers Gemisch), die 1 bis mehrere Tage lang in einer Lösung von Lakmoid in Aether gefärbt und in Balsam eingeschlossen werden; ferner die elastischen Fasern (p. 676) an Schnitten, die $^1/_2$—24 Stunden lang in einem Gemisch von $96\,^0/_0$ igem Alkohol (800 Theile), $1\,^0/_0$ iger Lösung von Kaliumkarbonat (40 Theile), in Wasser löslichem Magdalaroth (2 Theile) und Methylenblau (1 Theil) gefärbt sind, endlich die Blutgefässe (p. 681) an Schnitten (von Material aus Müllers Gemisch), die mit einer Lösung von Säurerubin (1—2 Theile) in $3\,^0/_0$ iger Essigsäure

(400 Theile) mehrere Minuten gefärbt, in 2 %iger Essigsäure ausgewaschen und in Helianthin etc. oder Chinablau (Wasserblau), die in analoger Weise gelöst sind, so lange nachgefärbt werden, bis das Rubin nur noch in den Erythrocyten bleibt. — S. auch WHITING (Trans. R. Soc. Edinburgh Vol. 38 1896 p. 311), SCHUMACHER (Arch. Mikr. Anat. 55. Bd. 1899 p. 151: elastisches Gewebe) und oben § 811 (OPPEL).

813. Niere. SAUER (Arch. Mikr. Anat. 46. Bd. 1895 p. 110) diskutirt ausführlich die Methoden zur Untersuchung des Epithels und erklärt zuletzt von Fixirmitteln für das beste das Gemisch von Carnoy (Alkohol absol. 60, Chloroform 30, Eisessig 10 Theile; 3—5 Stunden lang, dann direkt absoluter Alkohol); danach kommen ihm Alkohol (90 ccm von absolutem oder 90 %igem) mit Salpetersäure (10 ccm) und Perényis Gemisch. Der Ersatz des absoluten Alkohols durch Xylol muss sehr langsam geschehen, ebenso der Uebergang in Paraffin von 56° Schmelzpunkt. Die aufgeklebten Schnitte färbt man mit Eisenhämatoxylin und bringt sie zuletzt in 90 %igen Alkohol mit etwas Säurerubin, das den Härchensaum färbt. Zum Maceriren dienen Jodserum oder Drittelalkohol (nachher Färbung mit Dahlia).

814. Nebenniere und ähnliche Organe. HULTGREN & ANDERSSON (Skand. Arch. Phys. 9. Bd. 1899 p. 257) fixiren die Nebenniere entweder in Müllers Gemisch mit 4 % Formol oder in Altmanns Gemisch oder in einem Gemisch aus Kaliumbichromat, Formol und Alkohol. — Ueber die Nebenniere von *Rana* s. SRDÍNKO (Anat. Anz. 18. Bd. 1900 p. 502: ausser anderen Methoden Färbung der Schnitte mit Hämateïn-Mangan und Differenzirung durch Eisenalaun).

KOHN (Arch. Mikr. Anat. 53. Bd. 1898 p. 298) fixirt das Suprarenalorgan der Selachier entweder mit Sublimat (in Normalsalzwasser) oder Flemmings Gemisch oder Kaliumbichromat.

815. Phagocytäre Organe und Exkretionsorgane. Zum Studium der Milz und Niere bei den Vertebraten und der homologen Organe (Lymph- und Lymphoidorgane, Perikardialdrüse, Malpighischen Gefässe etc. etc. der Invertebraten) wird seit dem Vorgange von KOWALEWSKI (Biol. Centralbl. 9. Bd. 1889 p. 33) auch die Methode der sogenannten physiologischen Injektionen stark verwandt. Sie besteht im Wesentlichen darin, dass man in die Leibeshöhle oder die Gefässe theils feste Substanzen, in Wasser aufgeschwemmt, theils Flüssigkeiten einspritzt, um entweder die Reaktion der Organe auf Lackmus und andere Indikatoren (Säurefuchsin, Orange III) oder das Verhalten der Amöbocyten des Blutes und der Exkretionszellen festzustellen. Die

Zellen nehmen nämlich oft die festen Stoffe oder die aus den injizirten Flüssigkeiten im Körper ausgefällten Niederschläge in sich auf. Die Injektion selber erfolgt in der gewöhnlichen Weise. Von festen Stoffen verwendet man fein angeriebene Tusche oder Sepia, fein vertheiltes Karmin, Ferrum oxydatum saccharatum, auch wohl Erythrocyten von Wirbelthieren, Bakterien, Spermien; von gelösten Ammoniakkarmin oder Natronkarmin (fälschlich meist karminsaures Ammoniak oder Natron genannt), Indigkarmin, Lackmus, das erwähnte Eisensalz oder auch Eisenchlorid, Säurefuchsin, Alizarinblau S, Alizarinroth S, Bismarckbraun und andere Theerfarbstoffe, auch wohl Milch; als Vehikel dient Wasser, Normalsalzwasser oder Seewasser. Oft werden mehrere Stoffe zugleich injizirt.

Zur Erkennung in den Schnitten dienen, wenn die Stoffe nicht an sich charakteristisch genug sind, Färbungen; z. B. wird das Eisen durch Blutlaugensalz und Salzsäure nachgewiesen, die Erythrocyten durch Säurefuchsin, das Fett in der Milch durch Osmiumsäure. Auch wendet man Kontrastfärbungen für die Kerne an (z. B. Hämalaun bei Karmin). Bei der Fixirung der Organe muss man natürlich darauf achten, dass die in den Zellen enthaltenen Farbstoffe nicht alterirt werden. Besonders aber ist dafür zu sorgen, dass die zu injizirenden Lösungen absolut keine festen Partikel mehr enthalten; man lasse also die Flüssigkeit gut absetzen, schöpfe nur von oben und prüfe mit dem Mikroskope; dies scheint leider nicht nur früher beim Karmin, sondern auch neuerdings, öfter als gut ist, unterlassen zu werden.

Auch durch Fütterung von Thieren mit Karmin, Lackmus, Alizarinblau, Ferr. oxyd. sacch. etc. sind mancherlei Resultate über die Exkretionsorgane erhalten worden; so von Schindler, Eisig, Metschnikoff, Kowalewski etc.

S. ferner Schmidt (Arch. Gesammte Phys. 48. Bd. 1890 p. 34: Karmin für Niere von Vertebraten; enthält auch die ältere Literatur); Cuénot (Arch. Biol. Tome 16 1899 p. 51: Allgemeines über die Methode der phys. Injekt. und Anwendung auf die Mollusken); Kowalewski (s. oben; gibt einige ältere Literatur für Invertebraten).

———

31. Kapitel.

Einige Methoden zur Untersuchung niederer Thiere.

816. Allgemeines. In diesem Kapitel werden meist nur Abänderungen der gewöhnlichen Methoden angegeben, wie sie zum Studium mancher Organismen dienen können; dabei wird es sich jedoch fast immer um Methoden für histologische Zwecke handeln, nicht aber um solche zur Präparation von Thieren für Museen oder für die gröbere Anatomie. Freilich werden manchmal auch die histologischen Methoden mit gutem Erfolge für die anderen Zwecke dienen können.

Ueber die physiologische Injektion zur Erkennung der phagocytären Organe und Exkretionsorgane s. § 815.

Angaben über viele Methoden zur Konservirung von Seethieren macht Lo Bianco (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 435ff.; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 54). Alle Citate von Lo Bianco weiter unten beziehen sich auf diese Schrift. Neuerdings hat er übrigens seine Methoden theilweise geändert; hierauf ist weiter unten überall Rücksicht genommen worden. Es muss aber eigens hervorgehoben werden, dass auch jetzt noch von ihm die Thiere in erster Linie zur Aufstellung in Museen konservirt werden, nicht für histologische Zwecke.

S. auch oben § 76 die Angaben von Fol über die Konservirung mit Eisenchlorid.

Tunikaten.

817. Fixiren. Lo Biancos Methode zum Tödten einfacher Ascidien s. oben im § 22. Sie gilt übrigens nur von *Ciona, Ascidia* und *Rhopalaea;* andere hingegen *(Clavellina, Perophora* etc.) muss man erst 3—12 Stunden lang durch Chloralhydrat (1: 1000 Seewasser) betäuben, dann in einem Gemisch von 1 Theil 1 $^0/_0$ iger Chromsäure und 10 Theilen Essigsäure tödten und in 1 $^0/_0$ iger Chromsäure härten.

Die zusammengesetzten Ascidien mit kontraktilen Einzelthieren sind nicht leicht zu behandeln. Nach einer Methode von van Beneden, die mir (Lee) C. Maurice mitgetheilt hat, lässt man sie sich zuerst gut ausstrecken, ergreift sie dann mit den Fingern, steckt sie rasch in Eisessig, lässt sie 2—6 Minuten (je nach der Grösse; man nehme

übrigens recht kleine) darin und bringt sie (nicht mit einem eisernen Geräth, das Flecken geben würde) in 50 % igen Alkohol; hierin wäscht man sie gut aus und führt sie allmählich in stärkeren Alkohol über. — Lo Bianco narkotisirt sie mit Chloralhydrat (wie oben) und fixirt sie mit Sublimat oder Chromessigsäure.

Caullery (Bull. Sc. France Belg. Tome 27 1895 p. 4) betäubt die zusammengesetzten Ascidien mit Cocaïn nach Lahille (einige Tropfen einer 5 %igen Lösung auf 30 ccm Seewasser) rasch und fixirt sie dann hauptsächlich mit Flemmings Gemisch oder nach van Beneden mit Eisessig.

Schultze (Jena. Zeit. Naturw. 33. Bd. 1899 p. 266) betäubt *Ciona* mit Chromessigsäure nach Lo Bianco und fixirt sie mit Sublimatlösung oder Pikrinschwefelsäure. Die Operationen zum Studium der Regeneration des Ganglions nimmt er ebenfalls an betäubten Thieren vor, die dann in reinem Seewasser wieder aufleben.

Die meisten kleinen pelagischen Tunikaten fixirt man mit Osmiumsäure oder angesäuertem Sublimat. — Lo Bianco nimmt für *Pyrosoma* Alkohol von 50 % mit 5 % Salzsäure, bringt es aber nach $^1/_4$ Stunde durch Alkohol von 60 % in immer stärkeren. Die harten Salpen tödtet er mit 10 % iger Essigsäure, die halb weichen in 1 % iger Chromsäure mit 5 % Essigsäure, die weichen jetzt mit Formol und Chromsäure (oben § 109 a); die Dolioliden ebenso, aber auch mit Sublimat oder dem Gemisch von Kupfersulfat und Sublimat (oben § 79).

Bryozoen und Brachiopoden.

818. Bryozoen. Einige Methoden s. oben § 11 und 16—18. Lo Bianco empfiehlt für *Pedicellina* und *Loxosoma* Betäuben mit Chloralhydrat und Fixiren mit Sublimat. *Flustra, Bugula* etc. betäubt er mit Alkohol (oben § 16). S. auch unten § 863 (Braun).

Conser (Trans. Amer. Micr. Soc. Vol. 17 1896 p. 310) tödtet Süsswasserbryozoen mit Cocaïn, bringt sie auf 1 Stunde in 1 %ige Chromsäure, von da in Wasser und allmählich in Alkohol von 80 %.

Calvet (Contrib. Hist. Nat. Bryoz. Ectopr. Mar. Montpellier 1900 p. 15) fixirt die Bryozoen unter Anderem statt mit Flemmings Gemischen mit Chromsalzsäure (100 Th. $^1/_3$ % iger Lösung von Chromsäure und 1 Th. 3 % iger Salzsäure, oder 100 Th. $^1/_5$ % iger Chr. und 1 Th. 5 % iger S.). Zur Versilberung räuchert er, da die Methode von Harmer (oben § 359) nicht gut sei, die Thiere vorher mit Osmiumsäure (nach Ostroumoff) und wäscht sie sorgfältig aus (p. 31).

819. Brachiopoden. Lo Bianco tödtet die kleinen Thiere direkt in Alkohol von 70 %, grössere erst nach Betäubung mit Alkohol und Seewasser.

Blochmann (Untersuch. fein. Bau Brachiopoden Jena 1892 p. 5) fixirt am liebsten mit Sublimat und macerirt nach Hertwig (oben § 527), entkalkt mit 1 %iger Chromsäure (bei dickeren Schalen mit Zusatz von etwas Salz- oder Salpetersäure) oder mit Salpetersäure in Alkohol von 50—70 %, färbt hauptsächlich mit Delafields Hämatoxylingemisch (auch Eosin oder Orange G) oder mit Boraxkarmin und Indigkarmin und bettet in Paraffin oder Celloidin ein; in letzterem keine Schrumpfungen. Injektionen mit Berlinerblau oder mit 2 %iger blauer oder rother Gelatine. — Ekman (Zeit. Wiss. Z. 62. Bd. 1896 p. 172) hat den Stiel der Brachiopoden meist mit Flemmings Gemisch fixirt; er schneidet ihn aus freier Hand in Leber, nur selten in Paraffin. Färbung fast stets mit Böhmers Hämatoxylingemisch und Eosin.

Mollusken.

820. Fixiren. Zwei Ordnungen der Mollusken bereiten grosse Schwierigkeiten: die Lamellibranchier und die Gastropoden.

Um die Lamellibranchier ausgestreckt zu konserviren, narkotisirt sie Lo Bianco 6—12 Stunden (oder auch länger je nach der Spezies) mit Alkohol (oben § 16) oder Cocaïn (§ 18) und tödtet sie erst dann. — Carazzi (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 388) hält bei *Ostrea* die Narkose für äusserst wichtig, um Kontraktionen beim Konserviren möglichst zu vermeiden, oder auch beim Studium der frischen Gewebe, namentlich der Kiemen; er bedient sich ebenfalls des Zusatzes von Alkohol, empfiehlt aber, das Gefäss mit dem Thier warm zu halten (25° C.), und erzielt so in 24 Stunden völlige Narkose. Dann schneidet er zur Untersuchung der Kiemen alle 4 Lamellen aus, fixirt sie in einem Sublimatgemisch ähnlich dem von Gilson (oben § 64) 1—2 Stunden lang (den ganzen Körper der Auster, nachdem sie angeschnitten worden, 4—6 Stunden lang), bringt sie direkt in Jodalkohol, dann in absoluten Alkohol, schneidet die beiden äusseren Lamellen ab und bettet nur die beiden inneren, die also von allen bisherigen Operationen möglichst wenig gelitten haben, ein. — Gegenwärtig bedient sich Carazzi (nach mündlichen Angaben an Mayer) zur Fixirung der narkotisirten Thiere eines Gemisches von 1 Theil Formol und 3—4 Theilen Seewasser; 24 Stunden später wäscht er sie rasch mit 70 %igem Alkohol ab, bringt sie auf 24 Stunden in konzentrirte Lösung von Sublimat in Normalsalzwasser und von da direkt in 95 %igen Alkohol mit Jodjodkalium; dieser ist mehrere Male zu wechseln, aber oft müssen

auch die Schnitte nochmals mit Jod behandelt werden, um alles Quecksilber fortzuschaffen. Durch die Fixirung in Formol werden Schrumpfungen ganz vermieden.

Gastropoden. Lo Bianco narkotisirt mit Alkohol, noch besser aber mit Cocaïn (§ 18) die Prosobranchier und von den Heteropoden die Atlantiden. — Ueber die Erstickung von Landschnecken s. oben § 23, das Narkotisiren mit Hydroxylamin § 19. Die Opisthobranchier empfehle ich (Lee), rasch mit Perényis Gemisch oder Eisessig (§ 817) abzutödten. — *Aplysia* narkotisirt man nach Robert (Bull. Sc. France Belge Tome 22 1890 p. 449; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 216) durch subcutane Injektion von 1 ccm einer 5—10 %igen Lösung von Cocaïn; nach Schönlein (Zeit. Biol. 30. Bd. 1893 p. 187) ebenso mit 1 ccm einer 4 %igen Lösung von Pelletierin. — Lo Bianco gibt für die Opisthobranchier je nach Genus oder Spezies ganz verschiedene Mittel zum Betäuben und Fixiren an (s. Original p. 467). Von den Pteropoden fixirt er die Cymbuliiden mit Perényis Gemisch $^1/_4$ Stunde lang (dann in Alkohol von 50 %), *Hyalaea* mit Sublimat, *Creseis* hingegen betäubt er erst mit Alkohol und die Gymnosomen mit Chloralhydrat ($^1/_{10}$ %). Noch besser wirkt oft Cocaïn (§ 18).

Nach Heymans (Bull. Acad. Belg. (3) Tome 32 1896 p. 578) lassen sich die Cephalopoden durch Injektion von etwas Bromäthyl unter die Haut völlig lähmen, während die Athmung ruhig weiter geht (also ähnlich wie die Säugethiere durch Einathmen von Chloroform oder Aether).

Lo Bianco fixirt (nach mündlicher Mittheilung an Mayer) gegenwärtig die Cephalopoden mit seiner Chromessigsäure Nr. 1, die aber die doppelte Menge Essigsäure enthält, 24 Stunden lang, wäscht sie ebenso lange mit Wasser und bringt sie in Alkohol.

Nach meiner (Lee) Erfahrung halten sich Heteropoden und Pteropoden nach guter Fixirung mit Sublimat oder einem Chromgemisch wenigstens äusserlich sehr gut in Formaldehyd, besser als in Alkohol.

821. Leber. Mac Munn (Phil. Trans. Vol. 193 B 1900 p. 10) fixirt die Leber von Mollusken und *Homarus* in 20—30 %igem Formol (d. h. 1 Theil käufliches Formol + 4 oder $2^1/_3$ Theil Wasser) 12—24 Stunden lang, bringt sie von da direkt in 95 %igen Alkohol und bettet sie in Celloidin ein; die Schnitte färbt er mit Hämalaun etc. Schneidet man das Celloidin mit dem Gefriermikrotom, so lassen sich dünnere Schnitte erzielen als auf dem gewöhnlichen Wege.

822. Centralnervensystem. CARAZZI fixirt das der Cephalopoden nach seiner neuen Methode mit Formol und Sublimat (s. § 820).

NABIAS (Rech. hist. et organ. centres nerveux Gastéropodes Bordeaux 1894 p. 23) fixirt die Ganglien der Pulmonaten im geöffneten Thiere 1 Stunde lang in saurem Alkohol (6 Theile Eisessig auf 100 Theile Alkohol von 90 oder 100 %); oder 15—20 Minuten lang im Sublimatgemisch von Viallanes (§ 697), worauf er sie durch Wasser und schwachen Alkohol in 90 %igen überführt. Färbung der ganzen Ganglien vorzugsweise mit dem Hämatoxylin-Eosin von Renaut (§ 324), dem Hämatoxylin und Kaliumbichromat von Heidenhain (§ 257) und dem Hämatoxylinkupfer nach Viallanes (§ 697). Einbettung durch Chloroform (1 Stunde) in Paraffin von 56° Schmelzpunkt (1/2—1 Stunde). Auch Färbung nach der raschen Methode von Golgi mit der Modifikation, dass die Ganglien gleich nach der Behandlung mit Osmiumsäure und Bichromat in Celloidin eingebettet, und erst die Schnitte mit Höllenstein behandelt werden (ibid. p. 34). Färbung mit Methylenblau durch Legen der Ganglien in situ in eine 1 %ige Lösung 12 bis 24 Stunden lang.

McCLURE (Z. Jahrb. Abth. Morph. 11. Bd. 1897 p. 17) färbt die Nervenzellen von *Helix* und *Arion* entweder mit Methylblau und Eosin (ähnlich wie Mann, oben § 688; im Original steht Methylenblau!) oder mit Safranin und Lichtgrün (ähnlich wie Benda, § 327).

823. Augen der Gastropoden. FLEMMING (Arch. Mikr. Anat. 6. Bd. 1870 p. 441) wirft den Fühler sammt dem Auge, das sich beim Abschneiden des Fühlers einstülpt, in ganz schwache Chromsäure oder eine 4 % ige Lösung von Kaliumbichromat; darin stülpt es sich wieder aus und wird nun in letzterer Lösung oder mit Osmiumsäure oder Alkohol gehärtet.

CARRIÈRE (Z. Anzeiger 9. Jahrg. 1886 p. 221) fixirt das Auge nebst dem Stücke des Tentakels durch Dämpfe von Osmiumsäure und entpigmentirt (bei *Helix*) die Schnitte, die auf dem Objektträger mit Kollodium aufgeklebt sind, durch sehr verdünnte Eau de Javelle.

824. Augen der Cephalopoden und Heteropoden. GRENACHER (Abh. Nat. Ges. Halle 16. Bd. 1886 p. 213; Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 244) fixirt die Augen der Cephalopoden entweder in Pikrinschwefelsäure oder einer gesättigten Auflösung von Sublimat in Pikrinschwefelsäure (besonders gut für *Octopus, Eledone* und *Sepia*) und entpigmentirt sie mit Salzsäure (besser als mit Salpetersäure) oder dem oben § 574 angegebenen Gemisch; und zwar entweder sofort oder erst nach dem Färben mit Boraxkarmin, wo dann das Entpigmentiren und das Ausziehen des Karmins eine einzige Operation bilden. Man nimmt

hierzu am besten 2—5 mm dicke Stücke der Retina. Einlegen der Schnitte in Rizinusöl (§ 441).

Aehnliche Methoden wendet GRENACHER (ibid. 17. Bd. 1892 p. 3; Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 243) für die Augen der Heteropoden an.

LENHOSSÉK (Zeit. Wiss. Z. 58. Bd. 1894 p. 636; Arch. Mikr. Anat. 47. Bd. 1896 p. 45) untersucht die Augen der Cephalopoden nach der Golgischen Methode. Ebenso KOPSCH (Anat. Anzeiger 11. Bd. 1895 p. 362; Internation. Monatschr. Anat. Phys. 16. Bd. 1899 p. 34), der aber dabei statt der Osmiumsäure Formol nimmt.

HESSE (Zeit. Wiss. Z. 68. Bd. 1900 p. 418) fixirt die Augen der Heteropoden am besten mit Formol (1 : 4 Wasser) und führt sie dann behutsam in Alkohol über; der Glaskörper quillt nun beim Aufkleben der Schnitte mit Wasser nicht mehr. — Die Augen der Cephalopoden bleicht er (p. 456) theils nach Grenacher, theils nach Jander (oben § 575).

825. Augen der Lamellibranchier. S. PATTEN (Mitth. Z. Stat. Neapel 6. Bd. 1886 p. 733) und RAWITZ (Jena. Zeit. Naturw. 22. Bd. 1888 p. 115 und 24. Bd. 1890 p. 579: Pikrinsalpetersäure; zum Bleichen alkoholische Natronlauge, oben § 573).

HESSE (Zeit. Wiss. Z. 68. Bd. 1900 p. 380) entfernt das Pigment der Augen von *Arca* mit Chromsalpetersäure nach Jander (oben § 575). Die Augen von *Pecten* legt er unter Anderem nach dem Vorschlage von Th. List auf 5 Minuten in 10 $^0/_0$ iges Formol und fixirt sie dann mit Sublimat oder Pikrinsalpetersäure.

826. Schalen. Schliffe durch die Schalen erhält man leicht auf die gewöhnliche Art durch Schleifen oder wohl besser nach den Methoden von Koch oder Ehrenbaum (oben § 175 u. § 178). — MOSELEY (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 25 1885 p. 40) empfiehlt zum Entkalken eine 3—4 $^0/_0$ ige Salpetersäure.

827. Injektionen. FLEMMING (Arch. Mikr. Anat. 15. Bd. 1878 p. 252) bringt die zu injizirende Muschel durch Schnee und Salz zum Gefrieren und legt sie dann auf $^1/_2$ Stunde in lauwarmes Wasser; das Thier ist nun todt und zum Injiziren gut. Chloroform oder Aether taugen dazu nicht (s. hierzu oben § 19). Die Canüle bindet er ins Herz ein und umgibt die Schnittfläche der Schliessmuskeln und des Herzbeutels mit frisch angerührtem Gips. Ist dieser erstarrt, so kann man das Thier injiziren. — S. auch DEWITZ, Anleit. zur Anfert. zootom. Präp. Berlin 1886 p. 44 *(Anodonta)* und p. 52 *(Helix)*.

828. Methoden zum Maceriren des Epithels (s. auch § 830). ENGELMANN (Arch. Gesammte Phys. 23. Bd. 1880 p. 510) macerirt den Darm von *Cyclas*, nachdem er das Thier kurze Zeit auf 45—50° C. erwärmt hat, in $^1/_5$ %iger Lösung von Osmiumsäure oder in konzentr. Lösung von Borsäure. Ferner (p. 519) lassen sich die Fortsätze der Cilien in den Zellen isoliren, wenn man frisches Darmepithel von *Anodonta* in 4 %iger Lösung von Kaliumbichromat oder 10 %iger von Kochsalz zerzupft; will man sie aber in situ erhalten, so macerirt man die Zellen höchstens 1 Stunde lang in konzentr. Lösung von Bor- oder Salicylsäure (auch $^1/_{10}$ %ige Osmiumsäure ist gut). Die Seitenzellen der Kiemen behandelt man am besten (p. 535) mit Borsäure (5 Theile konzentr. Lösung und 1 Theil Wasser). S. auch oben § 102.

Das Gemisch von Haller s. § 529, das von Brock § 523, die von Möbius § 523 u. 528 (das zweite rühmt DROST sehr für *Cardium* und *Mya*, s. Morph. Jahrb. 12. Bd. 1886 p. 163). — PATTEN (Mitth. Z. Stat. Neapel 6. Bd. 1886 p. 736) empfiehlt sowohl zum Maceriren als auch Aufbewahren verdünnte Schwefelsäure (40 Tropfen auf 50 ccm Wasser); ganze Muscheln ohne Schale halten sich darin Monate lang.

829. Ueber die **Hautdrüsen der Aeolidier** s. oben § 806.

830. Mantelrand der Prosobranchier. BERNARD (Ann. Sc. N. (7) Tome 9 1890 p. 100) bedient sich zum Nachfärben der mit Gelatine (oben § 193) aufgeklebten Schnitte einer starken Lösung von Methylgrün oder Methylenblau in absol. Alkohol und Xylol (zu gleichen Theilen); speziell für die Nerven einer Lösung von Methylenblau in absol. Alkohol mit etwas fester Chromsäure. Das Epithel macerirt er (p. 101) in einem Gemisch von je 1 Theil Glycerin und Essigsäure, je 2 Theilen Alkohol von 90 % und Chromsäure von $^1/_{10}$ % und 40 Theilen Wasser. Dieses wirkt bereits in $^1/_4$ 3 Stunden. Auch (p. 102, 306) Chlorruthenium in schwacher Lösung ist gut, besonders für die Nervenbahnen, Schleimzellen und Cilien. Bereits in Alkohol befindliche Gewebe lassen sich nachträglich maceriren in einem Gemisch von Glycerin (1), Essigsäure (2), Alkohol (2) und Wasser (40).

Arthropoden.

831. Allgemeine Methoden. Zum Studium von Thieren mit chitinöser Haut sind die Methoden und Winke von MAYER (s. oben § 8, 9, 234 u. 235) in vieler Beziehung recht brauchbar. Jedenfalls ist es absolut nöthig, zum Fixiren, Auswaschen und Färben, wenn man die Thiere nicht öffnen kann oder darf, nur Flüssigkeiten zu verwenden, die leicht eindringen. Daher nehme man, wo es geht, Pikrinsäure-Gemische und zum Auswaschen und Färben alkoholische Mittel, also

z. B. die starke Pikrinschwefelsäure oder die Pikrinsalpetersäure, dann 70 %igen Alkohol hinterher. Jedoch ist auch Sublimat für viele Arthropoden ein vorzügliches Mittel, so z. B. für Copepoden und die Larven von Decapoden; mitunter verwendet man es vortheilhaft in alkoholischer Lösung. Manchmal ist auch Osmiumsäure gut (z. B. für *Copilia, Sapphirina* und die Phyllosomen).

Kann man vor dem Fixiren die Thiere öffnen oder zerschneiden, so verfährt man nach den gewöhnlichen Methoden.

832. Tracheaten. Die schwer durchlässigen Pauropoden fixirt Kenyon (Tufts Coll. Stud. No. 4 1896 p. 80) in Carnoys Gemisch (Alkohol, Chloroform und Essigsäure, s. § 82), schneidet sie zum Färben etc. entzwei und bettet sie schliesslich in Celloidin und nachher in Paraffin ein.

Die Chilopoden fixirt man nach Duboscq (Arch. Z. Expér. (3) Tome 6 1899 p. 483) am besten mit dem starken Gemisch von Flemming, aber brauchbar ist auch ein Gemisch gleicher Theile 1 %iger Chromsäure, 10 %iger Salpetersäure und 95 %igen Alkohols, also eine Modifikation des Perényischen Gemisches. Zum raschen Tödten dient ein stets frisch zu bereitendes Gemisch von 1 Theil Essigsäure und 10 Theilen absol. Alkohol. Formaldehyd ist nicht zu brauchen. Färbung der Schnitte entweder mit Safranin (konzentr. Lösung in Anilinwasser 24 Stunden lang, differenzirt durch Lösung von Pikrinsäure in absol. Alkohol) oder mit Eisenhämatoxylin oder mit Delafields Hämatoxylin und Eosin.

Duboscq theilt mir (Mayer) auf meine Anfrage mit, dass ein Gemisch von Perényi ohne Chromsäure genau so gut wirke wie mit ihr. Er hat ferner in Schnitten durch Material aus Flemmings Gemisch, wenn die gebräuchlichen Alaunhämateïne nur das Plasma färbten, nach Beizung mit Alaunlösung die Kerne sehr scharf mit wässeriger Lösung von Hämatoxylin tingirt erhalten.

Nach Michael (Trans. Linn. Soc. London (2) Vol. 7 p. 478) lässt sich die Acaride *Bdella* besser mit Pikrinschwefelsäure als mit Flemmings Gemisch fixiren, da dieses nur sehr schlecht eindringt.

S. auch unten § 834 (Hamann).

833. Crustaceen. Für marine ist nach Herbst (Arch. Entwickelungsmech. 9. Bd. 1899 p. 292) 1 %iges Formol in Seewasser das beste Fixirmittel.

Ostracoden fixirt Müller (Fauna Flora Golf. Neapel 21. Monogr. 1894 p. 8) mit einem Gemisch von 5 Theilen Aether und 1 Theil absoluten Alkohol und bringt sie dann in 70 %igen Alkohol. —

WOLTERECK (Zeit. Wiss. Z. 64. Bd. 1898 p. 601) fixirt *Cypris* mit Pikrinsublimatessigsäure (100 Th. gesättigte Lösung von Pikrinsäure, 50 Th. ebensolche von Sublimat, $2^1/_2$—5 Th. Essigsäure).

Für die Copepoden und Cladoceren des Süsswassers empfiehlt ZACHARIAS (Z. Anz. 22. Bd. 1899 p. 72) Chromessigsäure. — GIESBRECHT nimmt (nach mündlicher Angabe) für die marinen Copepoden eine konzentr. Lösung von Pikrinsäure in Seewasser, der er auch wohl etwas Osmiumsäure und Essigsäure hinzufügt. Ferner empfiehlt er für die Copepoden und Stomatopoden die Chromessigsäure von Lo Bianco (s. oben p. 424).

Nach NETTOVICH (Arb. Z. Inst. Wien 13. Bd. 1900 p. 3) fixirt man *Argulus* am besten mit dem auf 50° C. erwärmten Gemisch von Tellyesniczky (oben § 55).

834. Erweichen und Aufhellen des Chitins. Ueber die Anwendung von Eau de Javelle s. § 547. LIST (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 212) behandelt die gehärteten Cocciden 12—24 Stunden lang mit Eau de Javelle, die auf das 5fache verdünnt ist: das Chitin wird weich und erlaubt gute Schnitte.

HAMANN (Sitzungsb. Ges. Nat. Freunde Berlin 1897 p. 2) empfiehlt zum Fixiren von kleinen Tracheaten 10 %iges Formol. Das Chitin bleibe geschmeidig und lasse sich gut schneiden (ob in Paraffin, wird nicht gesagt).

KRÜGER (Entwicklung der Flügel. Göttingen 1899 p. 3) legt die Coleopteren auf 24 Stunden in 3 %ige Salpetersäure. — HERBST (Arch. Entwickelungsmech. 9. Bd. 1899 p. 291) bringt (nach Bethe, s. § 835) die Crustaceen allmählich in immer saureren Alkohol und lässt sie 4—8 Wochen in absolutem mit 12 % Salpetersäure (von 49 %).

Zum Erweichen des Chitins und zugleich zum Fixiren der Weichtheile von Tracheaten benutzt HENNINGS (Zeit. Wiss. Mikr. 17. Bd. 1900 p. 312) ein recht komplizirtes Gemisch aus 8 Th. Salpetersäure, 8 Th. $^1/_2$ %iger Chromsäure, 12 Th. gesättigter Lösung von Sublimat in 60 %igem Alkohol, 6 Th. gesättigter wässeriger Lösung von Pikrinsäure und 21 Th. absol. Alkohol.

Ueber das Entpigmentiren der Antennen von Myriopoden s. SAZEPIN (Mém. Acad. Pétersbourg Tome 32 1884 p. 11): Chloroform mit etwas rauchender Salpetersäure. — S. auch die Methode von Mayer (§ 568) und von Viallanes (§ 697).

Ueber die Prüfung auf Chitin s. ZANDER (Arch. Gesammte Phys. 66. Bd. 1897 p. 545).

835. Färben des Chitins. BETHE (Z. Jahrb. Abth. Morph. 8. Bd. 1895 p. 544; Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1896 p. 498) erzeugt im Chitin Anilinschwarz.

Die Objektträger mit den aufgeklebten Schnitten bringt er auf 3—4 Minuten in eine frische 10 %ige Lösung von Anilinchlorhydrat, der auf je 10 ccm 1 Tropfen Salzsäure zugesetzt worden ist. Dann spült er sie mit Wasser ab, legt sie, mit den Schnitten nach unten, in eine 10 %ige Lösung von Kaliumbichromat und wiederholt beide Operationen so oft, bis die Färbung intensiv genug wird. (Um Niederschläge zu vermeiden, müssen die Objektträger immer wieder gut mit Wasser abgespült werden.) Das Chitin ist zuerst grün, wird aber in Leitungswasser oder Alkohol mit etwas Ammoniak blau. — Speziell für die Otolithen von *Mysis* gilt folgendes Verfahren: man bringt sie auf 8—14 Tage in Alkohol von 40 % und fügt allmählich Salpetersäure hinzu, sodass schliesslich der Alkohol 20 % Säure enthält; das Chitin erweicht, und auch die Otolithen lockern sich, sodass man mitunter gute Schnitte durch sie erhält.

Zum Färben hellen, dünnen Chitins, besonders solchen, das vorher mit Kalilauge von den Weichtheilen etc. gereinigt worden und dann gut ausgewaschen ist, bediene ich (Mayer) mich schon seit vielen Jahren einer Lösung von Pyrogallussäure in Alkohol oder Glycerin. Wenn darin die Objekte zu dunkel geworden sind, so lassen sie sich durch eine schwache Säure, z. B. Essigsäure, wieder aufhellen.

836. Gehirn von Apis. Kenyon (Journ. Comp. Neur. Cicinnati Vol. 6 1896 p. 133) behandelt es nach Golgi (nur 15—20 % der Thiere geben gute Resultate) oder härtet es in einem Gemisch von 1 Theil Formol und 2 Theilen einer 5 %igen Lösung von Kupfersulfat und färbt es dann mit Hämatoxylin nach Mallory (oben § 266).

837. Bauchstrang. Binet (Journ. Anat. Phys. Paris 30. Année 1894 p. 469) fixirt den Bauchstrang der Hexapoden theils nach Flemming oder Hermann, theils mit Sublimat nach Viallanes (§ 697) und behandelt zum Studium der Zellen und Fasern (auch von Crustaceen) die ganzen Ganglien mit Hämatoxylinkupfer nach Viallanes (§ 697), färbt auch die Paraffinschnitte mit Safranin nach, das zuerst nur von den Bindegewebzellen aufgenommen wird. Die Methoden von Golgi und Ehrlich bieten vergleichsweise geringen Nutzen.

838. Augen. S. die älteren Methoden von Lankester & Bourne (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 23 1883 p. 180: *Limulus*), von Hickson (ibid. Vol. 25 1885 p. 243: *Musca*) und von Parker (Bull. Mus. Harvard Coll. Vol. 20 1890 p. 1; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 82: *Homarus*). Ferner oben § 306 und 574 die von Parker (*Scorpio* und Dekapoden, besonders *Astacus*) und Hennings.

Ueber das Präpariren der Augen der Phalangiden s. Purcell (Zeit. Wiss. Z. 58. Bd. 1894 p. 1): er bringt sie auf 20 Minuten in ein Gemisch einer gesättigten wässerigen Lösung von Pikrinsäure und

absol. Alkohol zu gleichen Theilen, das entweder kalt (für Retina und Rhabdome) oder auf 45 ° C. erwärmt (für Nervenfasern) angewandt wird.

HEMENWAY (Biol. Bull. Boston Vol. 1 1900 p. 207) macerirt die Augen von *Scutigera* 1 Jahr lang in einer Modifikation von Hallers Gemisch (1 Th. Glycerin, je 2 Th. Essigsäure und Wasser).

ROSENSTADT (Arch. Mikr. Anat. 47. Bd. 1896 p. 748) fixirt die Augen von Dekapoden in einem warmen Gemisch von 3 Theilen konzentr. Sublimatlösung und 1 Theil Perényischem Gemische und entpigmentirt sie in verdünntem, auf 56 ° C. erwärmtem Königswasser (Salzsäure und Salpetersäure je 3, Wasser 100) in wenigen Stunden.

Die Methode von Viallanes für Dekapoden s. oben § 697.

839. Leber. Ueber die Leber von *Homarus* s. oben § 821.

840. Injektion von kleinen Arthropoden, speziell Arachniden und Crustaceen. SCHNEIDER (Tablettes Zool. Poitiers Tome 2 1892 p. 123) empfiehlt dazu lithographische Tusche. Er betäubt die Thiere mit Chloroform, injizirt sie sofort und legt sie in starken Alkohol.

CAUSARD (Bull. Sc. France Belg. Tome 29 1896 p. 16) injizirt die Spinnen mit Tusche, bringt sie dann sofort in starken Alkohol und sezirt sie später unter Wasser, eventuell mit einer Spur Ammoniak, wie VOGT & YUNG (Lehrb. Prakt. Vergl. Anat. 2. Bd. 1889 p. 199) angegeben haben.

Würmer.

841. Enteropneusten. LO BIANCO (l. c. p. 460) fixirt sie mit Pikrinschwefelsäure oder $^1/_2$ $^0/_0$iger Chromsäure und betäubt sie auch wohl vorher mit Alkohol.

WILLEY (Z. Results Willey Cambridge Part 3 1899 p. 325) fixirt sie 12 Stunden lang mit einem Gemisch von 100 Th. 1 $^0/_0$iger Chromsäure und 2 Th. 1 $^0/_0$iger Osmiumsäure.

842. Myzostoma. WHEELER (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 227) fixirt sie mit Sublimat, Sublimat und Essigsäure, oder Pikrinsäure und Essigsäure; die Schnitte färbt er mit Eisenhämatoxylin (nach Heidenhain) und hinterher mit Orange G in konzentr. wässeriger Lösung.

843. Chätopoden. *Lumbricus* betäubt man, indem man ihn in Wasser mit etwas Chloroform bringt. PERRIER (Arch. Z. Expér. Tome 3 1874 p. 373) stellt das Chloroform in einem Schälchen neben das Gefäss mit dem Wasser, deckt über beide eine Glocke und findet später

die Würmer völlig ausgestreckt todt vor. — CERFONTAINE (Arch. Biol. Tome 10 1890 p. 327; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 210) injizirt den Thieren etwa 2 ccm einer $^1/_5$ $^0/_0$ igen Lösung von Curare und legt sie in Wasser, wo sie bereits in einer $^1/_4$ Stunde sterben. — Um *Criodrilus* zu tödten, bringt COLLIN (Zeit. Wiss. Z. 46. Bd. 1888 p. 474) ihn mit wenig Wasser in ein Glas und hängt darin einen Streifen Fliesspapier, der mit Chloroform getränkt ist, auf. — JAQUET (Bibliogr. Anat. Paris 3. Année 1895 p. 32) tödtet *Lumbricus* gut ausgestreckt in einer reichlichen Menge verdünnter Salpetersäure (1:125 Wasser).

KÜKENTHAL (*Mikrosk. Technik 1885; Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 61) narkotisirt die Anneliden entweder durch Alkohol in 4—8 Stunden oder durch 1 $^0/_0$ iges Chloralhydrat (in Seewasser). — LO BIANCO (l. c. p. 463) verwendet dazu Alkohol (5 $^0/_0$ absoluten) 2—12 Stunden lang und fixirt sie dann in Alkohol von 70 und 90 $^0/_0$; die allermeisten marinen Anneliden (s. im Original) lassen sich so behandeln, aber z. B. *Siphonostomum* erfordert erst eine 5 $^0/_0$ ige Lösung von Chloralhydrat und dann eine 1 $^0/_0$ ige Chromsäure; auch einige Röhrenwürmer betäubt er erst mit Chloralhydrat ($^1/_{10}$ $^0/_0$), damit sie aus ihren Gehäusen herauskommen. Die Alciopiden fixirt er in seinem Gemisch von Sublimat und Kupfersulfat (oben § 79), wäscht sie gut mit Wasser aus und bringt sie in Alkohol; ebenso die Tomopteriden, für die sich aber auch einfache Sublimatlösung eignet.

Ich (LEE) finde, dass die 1 $^0/_0$ ige Chromsäure, wie sie Lo Bianco anwendet, zwar für Schaustücke gut ist, histologisch aber weniger befriedigen wird als Sublimat. Letzteren darf man übrigens bei den Röhrenwürmern mit ihren zarten Kiemen nie warm verwenden, da diese häufig durch die Hitze schrumpfen; ähnlich empfindlich sind *Eunice* und *Onuphis*. Im Uebrigen vergl. die Methoden § 16—24; über das Gemisch von Ehlers s. § 42.

RIEVEL (Zeit. Wiss. Z. 62. Bd. 1896 p. 292) fixirt *Ophryotrocha* ausgestreckt in heissem Gemisch von Lang (oben § 63) 5—8 Minuten lang, *Lumbricus* in heissem Sublimat-Alkohol oder heisser Pikrinschwefelsäure 10—15 Minuten lang. — S. auch oben p. 34 (MICHEL).

EISIG (Fauna Flora Golf. Neapel 16. Monogr. 1887 p. 295) fixirt die betäubten (§ 16) Capitelliden, nachdem er sie mit Cactusstacheln festgesteckt und geöffnet hat, mit konzentr. Sublimatlösung, wäscht sie nach kurzer Zeit mit Seewasser ($^1/_2$ Stunde lang) aus, spült sie mit Wasser ab, färbt sie direkt mit Boraxkarmin, zieht aus etc. und führt

sie zuletzt durch Terpentinöl (4 Theile) und Kreosot (1 Theil) in Balsam über oder bettet sie in Paraffin ein. (Ueber die Maceration s. § 523.) Um ganze Organe herauszupräpariren, legt er vorher die Thiere auf mehrere Stunden in 1 $^0/_0$ ige Essigsäure.

Nervensystem. Hamaker (Bull. Mus. Harvard Coll. Vol. 32 1898 p. 91) betäubt *Nereis* mit Chloralhydrat oder Alkohol und fixirt sie mit Pikrinplatinosmiumessigsäure (oben § 98) oder Sublimatlösung mit 1 – 5 $^0/_0$ Essigsäure.

Ferner sind zu verwenden Methylenblau (s. auch unten § 887) und Höllenstein (rasche Methode von Golgi; s. Lenhossék in: Arch. Mikr. Anat. 39. Bd. 1892 p. 102). — S. auch Lewis (Anat. Anzeiger 12. Bd. 1896 p. 292) und die Methoden von Apáthy (oben § 696 und § 375).

Haut. Präparate von der ganzen Cuticula macht Lewis (Z. Bull. Boston Vol. 1 1898 p. 243) durch Narkotisiren der Thiere mit Alkohol, Einlegen in 10 $^0/_0$ ige Lösung von Chlornatrium und Abnehmen der losen Cuticula mit Messer und Pinzette.

Zur Topographie der Hautdrüsen s. die Methode von Racovitza (§ 806), über die Muskeln § 668.

Blutgefässe. Kükenthal (*Mikrosk. Technik Jena 1885; Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 61) öffnet die Thiere und legt sie auf 2—3 Stunden in Königswasser (2 Theile Salpetersäure und 1 Theil Salzsäure): die Gefässe treten auf gelbem Grunde schwarz hervor.

Reinigen des Darms von *Lumbricus*. Kükenthal (Biol. Centralbl. 8. Bd. 1888 p. 80) bringt die Thiere in ein hohes Glas voll feuchten Fliesspapiers; sie entleeren dann allmählich ihren erdigen Koth und füllen statt dessen ihren Darm mit Papier. — Vogt & Yung (Lehrb. Prakt. Vergl. Anat. 1. Bd. 1888 p. 448) empfehlen dafür Kaffeesatz zu nehmen, da dieser später in Paraffin nicht hart wird wie Papier, das sich schlecht schneidet. — Joest (Arch. Entwickelungsmech. 5. Bd. 1897 p. 425) hält die Würmer einige Tage lang in feuchter Leinewand und findet dann ihren Darm ganz leer. Zum Narkotisiren dient am besten Chloroformwasser (s. § 15).

844. Hirudineen. Zum Tödten dienen dieselben Methoden wie für *Lumbricus* (§ 843), ferner die im § 16—24. — Whitman (Methods p. 27) tödtet mit Sublimat, der ungemein rasch wirkt. — Ich (Lee) habe bessere Resultate durch Narkotisiren mit Kohlensäure (oben § 24) und Fixiren mit Flemmingschem Gemisch erhalten (kleine *Nephelis* sind schon nach einigen Minuten betäubt, grössere erst nach Stunden). Auch Citronensaft tödtet sie schön ausgestreckt. Zum Färben in toto finde ich Karmalaun ausgezeichnet; für Schnitte eignet sich mitunter

das Gemisch von Ehrlich-Biondi sehr gut. — GRAF (Jena. Zeit. Naturw. 28. Bd. 1893 p. 165, s. auch oben p. 67) narkotisirt mit Absud von Tabak. — Ueber das Macerirgemisch von Apáthy s. § 538.

APÁTHY (s. Carazzi, Manuale p. 272) legt die Thiere in ein Gemisch von 2 Th. Alkohol von 90 % und 3 Th. Wasser, nimmt sie heraus, sobald ihre Muskeln schlaff geworden sind (*Hirudo* nach 8—10, *Pontobdella* nach 3—4 Minuten), dehnt sie, steckt sie in einer Schale mit Cactusstacheln fest und fixirt sie mit Sublimat in wässeriger oder alkoholischer Lösung.

Injektionen. WHITMAN (Amer. Natural. Vol. 20 1886 p. 313) hat oft sehr gute Selbstinjektionen von Thieren erhalten, die mit schwacher Chromsäure oder ähnlichen Mitteln konservirt waren, und hält solche Injektionen zum Studium der Gefässe auf Schnitten für die besten. — JACQUET (Mitth. Z. Stat. Neapel 6. Bd. 1885 p. 298) legt die Thiere auf 1—2 Tage in Wasser mit etwas Chloroform und injizirt sie dann.

845. Gephyreen. Nach VOGT & YUNG (Lehrb. Prakt. Vergl. Anat. 1. Bd. 1888 p. 376) muss man *Sipunculus nudus* einige Tage in ganz reinem Seewasser halten, damit der Darmkanal frei von Sand wird, der ja beim Schneiden hinderlich sein würde, und dann mit Chloroform narkotisiren, um sie ausgestreckt fixiren zu können. — WARD (Bull. Mus. Harvard Coll. Vol. 21 1891 p. 144) betäubt die Thiere langsam (in 4—8 Stunden) mit Alkohol und bringt sie dann in 50 %igen Alkohol. — LO BIANCO (l. c. p. 462) fixirt sie entweder mit $^1/_2$ %iger Chromsäure oder narkotisirt sie mit $^1/_{10}$ %iger Lösung von Chloralhydrat in Seewasser; *Phascolosoma* und *Phoronis* schläfert er mit Alkohol ein. — Neuerdings verwendet er für die Larven von *Sipunculus* Cocaïn (§ 18).

Nach APEL (Zeit. Wiss. Z. 42. Bd. 1885 p. 461) lassen sich *Priapulus* und *Halicryptus* nur durch Hitze gut tödten: entweder erwärmt man das Wasser mit ihnen auf 40° C. oder man wirft sie in kochendes Wasser, holt sie rasch heraus, schneidet sie auf und härtet sie in $^1/_2$ %iger Chromsäure oder in Pikrinschwefelsäure.

METALNIKOFF (Zeit. Wiss. Z. 68. Bd. 1900 p. 265) betäubt *Sipunculus*, injizirt dann das Fixirgemisch (Sublimat mit Osmiumsäure nach Apáthy, Gilsons Gemisch etc.) in die Leibeshöhle, legt das Thier in dasselbe Gemisch, zerschneidet es, wenn die dicken Muskeln abgetödtet sind, und fixirt es weiter. Zum Färben ist besonders

gut Apáthys Nachvergoldung (oben § 375). Durch schwache Salpetersäure hebt sich die Cuticula oft mit der Epidermis und ihren Drüsen in toto ab (p. 264).

846. Rotatorien. Um die lebendigen Thiere unter dem Mikroskope in Ruhe beobachten zu können, empfiehlt Weber (Arch. Biol. Tome 8 1888 p. 713) eine 2 %ige Lösung von Cocaïn; auch warmes Wasser leistet bei den grösseren Arten, wie *Brachionus* und *Hydatina*, gute Dienste. — Hardy (Journ. R. Micr. Soc. London f. 1889 p. 475) setzt dem Wasser tropfenweise dicken Zuckersyrup zu, Hudson (ibid. p. 476) nimmt statt dessen eine schwache Lösung von Salicylsäure. — Ueber Hydroxylamin s. oben § 19, Chlormagnesium § 21, Wasserstoffhyperoxyd § 25. Auch mag man nach Braun (unten § 863), Eismond und Jensen (unten § 873) verfahren oder Methylenblau (oben § 300) oder Neutralroth (Scholtz in: Centralbl. Med. Wiss. 24. Jahrg. 1886 p. 449) etc. zu intravitalen Färbungen verwenden.

Dauerpräparate gewinnt man nach Rousselet (Journ. Quekett Micr. Club (2) Vol. 6 1895 p. 6), indem man dem Wasser in einem Uhrglase allmählich einige Tropfen eines Gemisches von 3 Theilen Cocaïn (in 2 %iger Lösung), 1 Theil Alkohol von 90 % und 6 Theilen Wasser zusetzt, dann, wenn die Cilien nicht mehr schlagen, zum Fixiren 1 Tropfen Flemmingschen Gemisches oder von $^1/_4$ %iger Osmiumsäure hinzugibt, aber schon nach spätestens $^1/_2$ Minute die Thiere mit einer Pipette herausholt, zum Auswaschen durch 2 oder 3 Uhrgläser voll Wasser hindurchführt und definitiv in Wasser (16 Theilen) mit Formol (1 Theil) aufhebt.

Conser (Trans. Amer. Micr. Soc. Vol. 17 1896 p. 310) behandelt die Rotatorien wie die Bryozoen (oben § 818), die Melicertiden aber speziell mit viel Cocaïn, dann mit Formol (20 %) und zuletzt mit Chromsäure ($^1/_2$ %). — Zograf (C. R. Acad. Sc. Paris Tome 124 1897 p. 245) narkotisirt sie mit Cocaïn, bringt sie auf 2—4 Minuten in Osmiumsäure ($^1/_4$—$^1/_5$ %), von da auf 5—10 Minuten in verdünnten rohen Holzessig (1 Theil mit 8—10 Theilen Wasser), alsdann in Wasser, Alkohol von 50—100 %, zuletzt in Glycerin oder Harz. (Dieselbe Methode, aber ohne Narkotisiren, ist auch gut für *Hydra* und Protozoen.)

Lenssen (La Cellule Tome 14 1898 p. 428) übergiesst *Hydatina* mit heisser konzentrirter Lösung von Sublimat, bringt sie sofort in Wasser, entwässert sie äussert vorsichtig, färbt sie schwach, bettet sie in filtrirtes Paraffin ein und färbt die Schnitte mit Hämalaun.

847. Acanthocephalen. Sie gut ausgestreckt und zugleich histologisch brauchbar zu konserviren, ist nicht leicht. Gewöhnlich kommt man mit Sublimat oder starker Osmiumsäure nicht weit, sogar nach Narkotisirung mit Tabakrauch oder Chloroform, jedoch hat HAMANN (Jena. Zeit. Naturw. 25. Bd. 1890 p. 113) gute Erfolge mit Sublimat und auch mit Alkohol und ein wenig Platinchlorid gehabt. — SÄFFTIGEN (Morph. Jahrb. 10. Bd. 1884 p. 121) tödtet die Thiere langsam in $^1/_{10}$ $^0/_0$ iger Osmiumsäure; zwar sind sie in den ersten Stunden stark kontrahirt, sterben aber schliesslich ganz ausgestreckt. Aehnlich verhält es sich mit $^1/_{10}$ $^0/_0$ iger Chromsäure: sie leben zwei Tage lang darin, sterben aber völlig ausgestreckt.

KAISER (Bibl. Z. Chun & Leuckart 7. Bd. 1891 p. 3; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 363) fixirt die Thiere entweder in heisser (56—60° C.) wässeriger Sublimatlösung 5—30 Minuten und legt sie zum Auswaschen in eine ebenso warme Lösung von Kampher in 60—70 $^0/_0$ igem Alkohol; oder in seinem Sublimatgemisch (oben § 62c); oder in einer gesättigten wässerigen Lösung von Cyanquecksilber, die, auf 45—50° C. erwärmt, $^1/_4$—1 Stunde lang einwirkt und dann durch 70 $^0/_0$ igen Alkohol ersetzt wird; oder in einem Gemisch von je 1 g Pikrinsäure und Chromsäure, 10 g Schwefelsäure und 1 Liter Wasser, ebenfalls warm (55° C.), 15—20 Minuten lang, wäscht sie 5—10 Minuten lang mit warmem Wasser aus und bringt sie auf einige Tage in Alkohol von 60 $^0/_0$. — Für Embryonen und kleine Thiere nimmt er eine kalt gesättigte Lösung von Quecksilberacetat in Wasser mit einer Spur Essigsäure.

848. Nematoden. Ihre undurchlässige Cuticula bereitet der guten Konservirung viele Schwierigkeiten. Diese lassen sich nach LOOSS (Z. Anzeiger 8. Jahrg. 1885 p. 318) durch Behandlung mit Eau de Javelle oder Labarraque (oben § 548) überwinden.

Zum Fixiren empfehlen die neueren Autoren meist Sublimatgemische; die Chromgemische scheinen die Gewebe brüchig zu machen. ZUR STRASSEN (Zeit. Wiss. Z. 54. Bd. 1892 p. 655) fixirt jedoch *Bradynema rigidum* wenigstens 12 Stunden lang in Flemmings Gemisch. — Nach AUGSTEIN (Arch. Naturg. 60. Jahrg. 1894 p. 255) eignet sich für *Strongylus filaria* am besten Pikrinsalpetersäure. — VEJDOVSKY (Zeit. Wiss. Z. 57. Bd. 1894 p. 645) empfiehlt für *Gordius* als bestes Fixirmittel $^1/_2$ $^0/_0$ ige Chromsäure (24 Stunden lang). — LO BIANCO (l. c. p. 462) fixirt die freien und parasitischen

marinen Nematoden mit konzentrirter Sublimatlösung oder Pikrinschwefelsäure.

COBB verwendet seinen Differentiator (oben p. 3) zum Ueberführen der Nematoden aus dem Fixirgemisch in Balsam.

Das Färben ist oft schwer, und mitunter ergibt nur alkoholisches Karmin (oben § 234) brauchbare Resultate.

BRAUN (*Thierische Parasiten d. Menschen 1. Aufl.; Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 5 1885 p. 897) fixirt kleine Nematoden in verdünntem Müllerschem Gemisch, bringt sie in Alkohol von 25 % und 40 %, darauf in Glycerin und Wasser zu gleichen Theilen, endlich definitiv in Glyceringelatine (20 Theile Gelatine, 100 Theile Glycerin, 120 Theile Wasser und 2 Theile Karbolsäure). Kanadabalsam soll sie mitunter trübe machen.

Demonstration lebender Trichinen. BARNES (*Amer. Month. Micr. Journ. Vol. 14 1893 p. 104; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1893 p. 406) verdaut ein Stück Trichinenfleisch mit Pepsin und Salzsäure 3 Stunden lang bei 37° C., setzt so die Trichinen in Freiheit und untersucht sie auf einem heizbaren Objekttisch.

849. Nemertinen. Bei meinen (LEE) mannigfachen Versuchen zum Fixiren hat mir die kalte Sublimatlösung mit etwas Essigsäure noch die besten Dienste geleistet. Dagegen kann ich die Osmium- und Chromgemische nicht empfehlen, denn sie (besonders die letzteren und auch Eisenchlorid) bringen solche Kontraktionen der Muskeln zu wege, dass die Thiere ganz ihre Form verlieren; auch tödten sie nicht so rasch wie Sublimat. Grösseren Thieren schneide ich den Kopf ab, zerlege sie in nicht zu lange Stücke und werfe sie gleich in die Sublimatlösung, wo sie sich weniger stark kontrahiren, als wenn sie noch mit den Cerebralganglien in Zusammenhang sind. Besser als diese Methoden ist vielleicht die einfache, die mir DU PLESSIS angerathen hat, nämlich das Fixiren mit nahezu kochendem Wasser. Die wenigen Thiere, die ich so konservirt habe, sind ausgestreckt gestorben, ohne ihren Rüssel auszustossen; daher ist dies besonders für die grösseren Spezies wohl den Versuch werth.

LO BIANCO (l. c. p. 461) betäubt die Nemertinen mit $^1/_{10}$ %iger Lösung von Chloralhydrat in Seewasser, worin sie 6—12 Stunden bleiben, und härtet sie dann in Alkohol von 70 %; besonders resistente Spezies kommen aus dem ersten Chloralhydrat noch auf einige Stunden in eine $^2/_{10}$ %ige Lösung. — Neuerdings verwendet er Cocaïn (s. oben § 18).

DENDY (Proc. R. Soc. Victoria f. 1891 1892 p. 89; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1893 p. 116) narkotisirt *Geonemertes* mit Dämpfen von Chloroform $^1/_2$ Stunde lang und konservirt sie dann in starkem Alkohol.

Zum Färben in toto empfehle ich (LEE) nur alkoholische Mittel, besonders Boraxkarmin oder Mayers Karmin. Einbettung in Paraffin nach Durchtränkung mit Cedernöl (nicht mit Chloroform, das oft selbst nach Wochen noch nicht eingedrungen ist).

BÜRGER (Fauna Flora Golf. Neapel 22. Monogr. 1895 p. 443) wendet zum Studium des Nervensystems, der Nephridien, Haut, Muskulatur und des Darmes die Färbung mit Methylenblau intra vitam (oben § 303) an. Ferner macerirt er die Körperwand mit Drittelalkohol oder Hertwigs Osmiumessigsäure (§ 666). Die grossen Spezies betäubt und fixirt er nach Lo Bianco, die kleinen legt er direkt in das Fixirgemisch (heisse konzentrirte Sublimatlösung oder Sublimateisessig) oder übergiesst sie damit, bringt sie aber bereits nach einigen Minuten in 70 %igen Alkohol, der überhaupt für die Nemertinen das beste Medium ist. Färben in toto mit Boraxkarmin, Hamanns Karmin, Pikrokarmin oder noch besser mit Mayers alkohol. Karmin, ferner mit Hämalaun; Einbetten durch Xylol in Paraffin bei 50—54 ° C., aber höchstens 6—8 Stunden lang, damit sie nicht zu hart werden. Aufkleben der Schnitte mit Eiweiss und Gelatine (oben § 193), Nachfärben mit Eosin, Ehrlichs Hämatoxylin, Methylgrün etc. etc.

MONTGOMERY (Z. Jahrb. Abth. Morph. 10. Bd. 1897 p. 6) empfiehlt zum Fixiren vor Allem Sublimat (für die kleineren Spezies in konzentrirter wässeriger Lösung, 40 ° C. warm, für die grösseren in 50 %igem Alkohol gelöst), ferner Hermanns, Flemmings und Perényis Gemisch, räth dagegen ab von Chromsäure, Pikrinsäure, Pikrinschwefelsäure und absolutem Alkohol. Zum Studium der Zellstruktur reichen die Färbungen in toto nicht aus. Zur Ueberführung aus dem Alkohol in Paraffin und überhaupt als Intermedium eignet sich am besten Cedernöl. Speziell das Bindegewebe färbt sich gut mit Hämateïnthonerde, Biondis Gemisch. Borax- und Indigkarmin, Alaunkarmin oder mit Safranin, Gentianaviolett und Orange G. — S. auch BÖHMIG (Zeit. Wiss. Z. 64. Bd. 1898 p. 484).

850. Cestoden. Sie müssen hauptsächlich nach den gebräuchlichen Schnittmethoden studirt werden. Immerhin kann die Beobachtung am lebenden Thiere dienlich sein; nach PINTNER (Vogt & Yung, Lehrb. Prakt. Vergl. Anat. 1. Bd. 1888 p. 202) bleiben Tänien einige Tage in gewöhnlichem Wasser mit ein wenig Eiweiss am Leben. — Nach LÖNNBERG (Centralbl. Bakt. 11. Bd. 1892 p. 89) hat *Triaenophorus nodulosus* sogar 1 Monat lang in einer „schwach sauren Pepsinpeptonlösung“ (3—4 % mit nicht ganz 1 % Chlornatrium) gelebt.

ZERNECKE (Z. Jahrb. Abth. Morph. 9. Bd. 1895 p. 92; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1896 p. 494) hat mit gutem Erfolge Golgis Methode mit Höllenstein angewandt. Er tödtet *Ligula* mit dem Gemisch von Osmiumsäure und Kaliumbichromat (4:1).

imprägnirt wie gewöhnlich, schneidet sie in Leber und behandelt sie mit Hydrochinon nach Kallius (§ 751). Auch Methylenblau leistete ihm gute Dienste.

Tower (Z. Anzeiger 19. Bd. 1896 p. 323; Z. Jahrb. Abth. Morph. 13. Bd. 1900 p. 362) fixirt die Cestoden zum Studium des Nervensystems in Platinpikrinosmiumsäure (500 Pikrinsäure, 5 Platinchlorid, 3 Essigsäure, 2 Osmiumsäure) 10 Stunden lang, schneidet sie in Stücke von 1—3 cm Länge und legt diese auf 6—10 Stunden in rohen Holzessig und nachher auf 24 Stunden in 70 %igen Alkohol. Einbettung in Paraffin.

Köhler (Zeit. Wiss. Z. 57. Bd. 1894 p. 386) wickelt die vorher mit Salzwasser (0.6 %) abgespülte Tänie über eine Glasplatte oder spannt sie mit Igelstacheln auf Kork fest und fixirt sie 2—3 Stunden lang mit 5 %iger Sublimatlösung. Dann 70 %iger Alkohol. Färbung der Schnitte 24 Stunden lang mit Orange G (auf 100 g der gesättigten Lösung 5 Tropfen Eisessig), dann nach dem Auswaschen in destill. Wasser mit Hämateïnthonerde. Oder die Thiere kommen (nach Hermann, s. § 377) aus dem Alkohol auf 3 Stunden in Wasser, dann auf 1 Tag in $^1/_4$ %ige Osmiumsäure und nach 2stündigem Auswaschen auf 1 Tag in rohen Holzessig, von da wie gewöhnlich in Paraffin.

851. Trematoden. Fischer (Zeit. Wiss. Z. 40. Bd. 1884 p. 5) bettet *Opisthotrema* zum Schneiden in Seife ein (6 Theile in 7 Theilen 96 %igem Alkohol; die Masse schmilzt bei etwa 60° C., dringt sehr rasch ein und erstarrt auch sehr rasch) und legt die Schnitte in Glycerin. — Wright & Macallum (Journ. Morph. Boston Vol. 1 1887 p. 1) fixiren *Sphyranura* in Flemmings Gemisch und färben sie mit Alauncochenille. — Lo Bianco (p. 460) fixirt die Trematoden mit heisser konzentr. Sublimatlösung. — Looss (Arch. Mikr. Anat. 46. Bd. 1895 p. 7) fixirt *Bilharzia* in warmer (50—60° C.) 1 %iger Lösung von Sublimat in 70 %igem Alkohol.

Mühling (Arch. Naturg. 64. Jahrg. 1898 p. 5) lässt das Thier sich auf einem Deckglase gut ausbreiten und drückt letzteres schnell auf einen mässig erwärmten Objektträger, auf dem sich bereits ein Tropfen des Fixirgemisches (je 50 Th. Pikrinsalpetersäure und Wasser und 2 Th. Essigsäure) befindet; dann Abspülen mit Wasser und langsames Ueberführen in 70 %igen Alkohol.

Bettendorf (Z. Jahrb. Abth. Morph. 10. Bd. 1897 p. 308) hat mit der schnellen Golgischen Methode nur bei *Distoma hepaticum* gute Resultate erhalten und zieht das Methylenblau (0,1 g, Salz 0,75 g, Wasser 100 ccm) vor.

Für Cercarien ist nach Schwarze (Zeit. Wiss. Z. 43. Bd. 1885 p. 45) das einzige gute Fixirmittel kalt gesättigte Sublimatlösung auf

35—40° C. erwärmt. — S. auch oben § 388 und 336 die Methoden von Hofmann für die Cercariäen von *Distomum*.

852. Turbellarien. Braun (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 398) bringt, um Rhabdocölen ganz zu konserviren, die lebenden Thiere auf einen Objektträger, plattet sie mit dem Deckglase etwas ab und lässt unter das Deckglas ein Gemisch von 1 Theil 1 %iger Osmiumsäure und 3 Theilen Langschem Gemisch (oben § 63) fliessen. Er bettet sie später in Paraffin ein. — Böhmig (ibid.) findet für Muskeln und Parenchym Salpetersäure und Pikrinschwefelsäure sehr gut.

Delage (Arch. Z. Expér. (2) Tome 4 1886 p. 114; Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 239) fixirt *Convoluta* mit seinem Gemisch von Karmin und Osmiumsäure (oben § 230) oder auch mit konzentrirter Lösung von Eisenoxydulsulfat. Er färbt sie entweder mit seinem Gemisch oder mit Goldchlorid, indem er Ameisensäure (1 Theil mit 2 Theilen Wasser) 2 Minuten lang, dann 1 %iges Goldchlorid 10 Minuten, endlich 2 %ige Ameisensäure 2—3 Tage lang im Dunkeln einwirken lässt, recht stark am Lichte reduzirt und mit einer 1 %igen Lösung von Cyankalium die Färbung wieder blasser macht. — Böhmig (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 241) hat gute Bilder von Plagiostomiden erhalten, die mit Sublimat fixirt und mit Osmium-Karmin gefärbt waren.

Nach Graff (Organisation d. Turbellaria acoela, Leipzig 1891; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 76) ist die Fixirung mit Flemmings Gemisch und die Färbung mit Hämateïnthonerde gut für die Haut (allerdings nicht für die Rhabdite der Acölen und Allöocölen), desgleichen für das Parenchym von *Amphichoerus cinereus, Convoluta paradoxa* und *sordida*. Sublimat ist gut für *C. roscoffensis*. Bei einigen Species muss man Pikrokarmin vermeiden, da es das centrale Parenchym zerstört. Das Nervensystem behandle man nach Delage (s. oben).

Die Dendrocölen fixirt man mit Sublimatlösungen, mitunter heiss. Chichkoff (Arch. Biol. Tome 12 1891 p. 438) nimmt für die Süsswasserarten ein Gemisch von 6 Theilen 2 %iger Lösung von Sublimat, 4 Theilen 15 %iger Essigsäure, 2 Theilen Salpetersäure, 8 Theilen 14 %iger Lösung von Chlornatrium und 1 Theil 2 %iger Lösung von Alaun. — S. ferner die Gemische von Lang (oben § 63).

Lo Bianco (l. c. p. 461) tödtet Rhabdo- und Dendrocölen mit heisser Sublimatlösung, schüttet sie sofort in viel kaltes Wasser und bringt sie dann in Alkohol. Einige Polycladen vertragen jedoch nur schwach erwärmte Sublimatlösung.

Voigt (Verh. Nat. Ver. Bonn 53. Jahrg. 1896 p. 118) konservirt *Planaria*, indem er das Wasser abschüttet, sie durch Uebergiessen mit

einem Gemisch von 1 Theil konzentr. Salpetersäure und 3 Theilen Wasser tödtet und nach 1 Minute in 70—90 $^0/_0$ igen Alkohol bringt. — KLINKOWSTRÖM (Arch. Mikr. Anat. 48. Bd. 1897 p. 589) fixirt *Prostheceraeus* nach Boveri in 70 $^0/_0$ igem Alkohol mit 4 $^0/_0$ Eisessig.

Die Landplanarien fixirt GRAFF (Monogr. Turbell. 2. Triclad. terr. 1899 p. 38) mit heisser konzentr. Sublimatlösung (ohne oder mit 1 $^0/_0$ Essigsäure). Zum Durchfärben nimmt er Alaunkarmin (eventuell Tage lang), als Intermedium für Paraffin Cedernöl (Xylol ist nicht brauchbar). Die Schnitte färbt er mit Eisenhämatoxylin oder anderen Gemischen.

JÄNICHEN (Zeit. Wiss. Z. 62. Bd. 1896 p. 256) empfiehlt für Planarien, besonders ihre Augen, Pikrinschwefelsäure (1—2 Stunden lang, dann Alkohol von 70 $^0/_0$). Osmiumsäure ist nicht gut, und Müllers Gemisch macerirt geradezu. Die Schnitte durch die mit Boraxkarmin gefärbten und mit Salzsäure-Alkohol entfärbten Thiere kommen auf 10 Minuten in Osmiumsäure (Stärke nicht angegeben), dann auf 5—10 Minuten in Holzessig, beides „auf dem Wärmschrank“. Maceration der Sehkolben in einem Gemisch von 100 ccm Wasser, 1 ccm Essigsäure und 1 g Kochsalz. Zum Bleichen des Augenpigmentes dient Wasserstoffhyperoxyd.

Echinodermen.

853. Allgemeines. CUÉNOT (Arch. Biol. Tome 11 1891 p. 316) fixirt die Echinodermen mit den gebräuchlichen Mitteln, hebt sie in 90 $^0/_0$ igem Alkohol auf, entkalkt sie in 70 $^0/_0$ igem, der mit etwas Salpeter- oder Salzsäure versetzt ist, bringt sie nach dem Entkalken zur völligen Entfernung der Kohlensäure auf wenigstens 12 Stunden in reinem Alkohol unter die Luftpumpe und färbt sie vor dem Schneiden doppelt: mit Pikro- oder Boraxkarmin und mit einer Lösung von Methylenblau in absol. Alkohol. Auch färbt er wohl die aufgeklebten Paraffinschnitte 12—18 Stunden lang mit einer Art Ehrlichschen Gemisches (konzentr. Lösung von Methylgrün 3 Theilen, von Orange III 2 Theilen und von Säurefuchsin 1 Theil), das zuvor mit dem 150fachen an Wasser verdünnt ist. S. auch oben § 550.

BOVERI (Zellen-Studien Heft 4 Jena 1900 p. 30) lässt die Eier von Echinodermen in seiner Pikrinessigsäure etwa 8 Tage lang, setzt dann successive Alkohol von 50 und 70 $^0/_0$ allmählich zu und wäscht sie auf diese Weise ganz langsam aus.

854. Holothurioideen. Sie sind schwer zu fixiren, da sie sich leicht so stark zusammenziehen, dass sie ihre Eingeweide ausspeien oder sich selber zerstückeln. Lo Bianco (l. c. p. 459) lässt *Holothuria* und *Stichopus* in reinem Seewasser ihre Tentakel ausstrecken, presst sie dicht dahinter mit den Fingern oder der Pincette so stark zusammen, dass sie diese nicht wieder zurückziehen können, und taucht sie mit dem Vorderkörper in konzentrirte Essigsäure; zugleich injizirt ein Assistent durch den Anus 90 $^0/_0$ igen Alkohol, und sowie das Thier todt ist, wird es in 70 $^0/_0$ igem konservirt. Aehnlich werden die anderen Holothurien getödtet, indessen erfordert fast jedes Genus eine besondere Art der Behandlung. Die grossen *Synapta* kommen zuerst in ein Gemisch gleicher Theile von Seewasser und Aether (oder Chloroform), sterben darin ganz ausgestreckt und werden durch Wasser und schwachen Alkohol allmählich in starken gebracht. — Neuerdings narkotisirt er die Thiere, damit sie die Tentakel gut ausstrecken, mit Cocaïn (oben § 18).

Nach Mittheilung von Dr. Weber an mich (Lee) lassen sich die Holothurien vorzüglich in einer schwachen Lösung von Formaldehyd aufbewahren.

Gerould (Bull. Mus. Harvard Coll. Vol. 29 1896 p. 125) lähmt *Caudina* mit Magnesiumsulfat nach Redenbaugh (oben § 21) und fixirt sie dann mit Perényis Gemisch, die Ovarien jedoch mit Sublimat. Die Zellgrenzen der Epithelien stellt er nach dem Abspülen der frischen Gewebe in destill. Wasser mit 1 $^0/_0$ iger Höllensteinlösung dar. Die Nerven liessen sich nach Golgi oder mit Methylenblau nicht nachweisen.

Hérouard (Arch. Z. Expér. (2) Tome 7 1889 p. 537) tödtet *Cucumaria* durch Eintauchen in eine 40° C. warme 1 $^0/_0$ ige wässerige Lösung von Chloralhydrat, während man ihr mit einer Pincette den Anus zuhält, sodass sie sich nicht kontrahiren kann.

Ueber das Färben der Muskeln mit Methylenblau s. Iwanzoff (Arch. Mikr. Anat. 49. Bd. 1897 p. 103).

855. Echinoideen. Ich (Lee) rathe an, das Fixirmittel zu injiziren. Nach Weber ist Formaldehyd für die definitive Konservirung dem Alkohol weit überlegen.

Lo Bianco (l. c. p. 458) tödtet die Echinoideen wie *Luidia* (s. unten p. 443) oder aber macht 2 Löcher in die Schale, lässt alles Wasser auslaufen und dafür Alkohol eintreten.

Ueber das Schleifen der Stacheln s. oben § 177.

856. Asteroideen. HAMANN (Beitr. Hist. Echinodermen 2. Heft 1885 p. 2) injizirt das Fixirmittel vom Ende eines Armes aus in die Leibeshöhle und wirft das Thier, sobald die Füsschen und Kiemen geschwollen sind, in eine tüchtige Menge desselben Mittels. Speziell die Augen schneidet er ab, härtet sie in einem Gemisch gleicher Theile 1 %iger Osmiumsäure und 1 %iger Essigsäure, bettet sie in Gummiglycerin (oder eine andere Masse, die keine Vorbehandlung mit Alkohol nöthig macht) ein und erhält so Schnitte mit dem Pigment in situ; zum Maceriren dient Drittelalkohol.

Nach WEBER ist Formaldehyd zur Aufbewahrung darin nicht brauchbar. — LO BIANCO (l. c. p 458) lässt die Thiere, auf den Rücken gelegt, in Alkohol von 20—30 % sterben, wenn er die Füsschen gut ausgestreckt haben will; *Luidia* wird in derselben Lage mit Chromessigsäure (10 Theilen Essigsäure, 1 Theil 1 %iger Chromsäure) übergossen und sofort in schwachen Alkohol gebracht. *Brisinga* ist direkt mit absolutem Alkohol zu tödten.

GOTO (Journ. Coll. Sc. Japan Vol. 10 1898 p. 239) fixirt die Eier von *Asterias* in einem Gemisch von 16 Th. konz. wässeriger Sublimatlösung, 3 Th. Glycerin, 1 Th. Eisessig und 50 Th. Wasser 3—5 Minuten lang und bringt sie gradatim in Alkohol von 30—70 %. Er empfiehlt obiges Gemisch für zarte pelagische Larven.

857. Ophiuroideen. Die kleinen kann man nach LO BIANCO (l. c. p. 458) direkt mit schwachem Alkohol fixiren, *Ophiopsila* mit absol. Alkohol, *Ophiomyxa* mit 1/2 %iger Chromsäure. Die übrigen lässt man zuvor in Süsswasser absterben, damit sie die Arme nicht abwerfen.

RUSSO (Ricerche Lab. Anat. Roma Vol. 4 1895 p. 157) fixirt *Ophiothrix* in Osmiumsäure (etwa 1/2 %ig) 1—2 Stunden lang und entkalkt sie dann durch 6—10tägiges Einlegen in Müllers Gemisch. Gut ist auch ein Gemisch von 2 Theilen konzentr. Sublimatlösung, 1 Theil 70 %igem Alkohol und 1 Theil Essigsäure (spez. Gew. 1,06); die Thiere bleiben darin 3 Minuten und werden dann entweder in Müllers Gemisch oder in 70 %igem Alkohol mit 10 % Essigsäure entkalkt. Zur Färbung dient Parakarmin.

858. Crinoideen. LO BIANCO (l. c. p. 458) konservirt *Antedon rosacea* direkt mit 70 %igem, *phalangium* mit 90 %igem Alkohol.

859. Larven und Eier (s. auch § 853). BARROIS (Lee & Henneguy, Traité 2. Ed. 1896 p. 457) möchte bei der Anfertigung von Präparaten zum Studium der Metamorphose nicht nur das Kalkskelett intakt

erhalten, sondern auch die übrigen Gewebe so härten, dass man die Larven unter dem Mikroskope unbeschädigt in jede beliebige Lage bringen, endlich aber die Region, wo das junge Thier sich anlegt, klar übersehen kann. Er empfiehlt daher folgende Methoden. Die Pluteus fixire man 2—3 Minuten lang mit konzentr. Sublimatlösung, wasche sie mit Wasser und bringe sie auf 12—24 Stunden in Cochenilletinktur (oben § 235), die aber mit Alkohol von 70 % so verdünnt sein muss, dass sie kaum noch gefärbt aussieht. Man nehme aber die Larven im richtigen Moment heraus und schliesse sie in Balsam oder oft besser noch in Nelkenöl oder Cedernöl ein. Bipinnarien und Auricularien behandle man ebenso, jedoch die ersten Stadien der Metamorphose fixire man mit Osmiumsäure, färbe sie mit Beales Karmin und schliesse sie in Glycerin ein: Die Larven von *Antedon* fixire man mit Langs Gemisch (oben § 63) und färbe sie mit verdünntem Boraxkarmin.

Das Betäuben vor dem Fixiren ist nützlich, besonders für die Pentacrinus-Stadien (Lo Bianco thut es neuerdings mit Cocaïn, s. oben § 18), die sich sonst ganz zusammenschliessen, und die jungen Synapten, die sonst durch Kontraktion verunstaltet werden.

Mac Bride (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 34 1892 p. 131) fixirt die Larven von *Amphiura* mit ½ %iger Osmiumsäure wenigstens 10 Minuten lang (mit 1 %iger nur 5 Minuten), spült sie mit Wasser ab, bringt sie auf 18—20 Stunden in Müllers Gemisch, dann in Alkohol von 30—90 % und entkalkt sie am folgenden Tage mit ½—1 %iger Salpetersäure in 90 %igem Alkohol. — Die Larven von *Asterina* fixirt er (ibid. Vol. 38 1896 p. 340) ebenfalls mit Osmiumsäure, bringt sie auf 12—24 Stunden in Müllers Gemisch, bettet sie in Celloidin und nachher in Paraffin ein und färbt die Schnitte mit Karmalaun oder Delafields Hämatoxylin. Von beiden Farbstoffen nehmen sie mehr auf, wenn man sie vorher 24 Stunden lang in Boraxkarmin lässt. Die mit Wasser aufgeklebten Schnitte lösen sich nicht so leicht ab, wenn man sie aus dem Terpentinöl durch Nelkenöl in 90 %igen Alkohol bringt.

Seeliger (Z. Jahrb. Abth. Morph. 6. Bd. 1892 p. 168; Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 229) wirft Stücke der Pinnulae von *Antedon* in eine erkaltete heiss gesättigte Lösung von Sublimat in Seewasser (für die Furchung nach Zusatz von $^1/_{50}$—$^1/_{60}$ Vol. konzentr. Essigsäure) und bringt die Embryonen dann in Alkohol von 20—80 %. Soll der Kalk erhalten bleiben, so fixirt er sie direkt in absol. Alkohol.

Cölenteraten.

860. Nesselkapseln. Iwanzoff (Bull. Soc. Natural. Moscou (2) Tome 10 1896 p. 97) empfiehlt für die Nesselkapseln der Aktinien Maceration nach Hertwig in einem Gemisch von gleichen Theilen 0.04 %iger Osmiumsäure (in

Seewasser) und 0.2 %igem Eisessig (in Seewasser), noch mehr Fixation mit Dämpfen von Osmiumsäure 2—5 Minuten lang, dann kurzes Auswaschen in Seewasser oder destill. Wasser: weniger gut sei der Ranviersche Drittelalkohol. Für die Nesselkapseln der Medusen zum Tödten nach Hertwig ein Gemisch gleicher Theile von 0.5 %iger Osmiumsäure und 0.2 %igem Eisessig, beides in destill. Wasser; die weitere Maceration in 0.1 %iger Essigsäure. Oder auch eine Lösung von Methylgrün und Gentianaviolett mit etwas Osmiumsäure, um gleichzeitig zu fixiren und zu färben.

861. Aktinien. Ueber das Betäuben s. oben § 13 ff.

Fixiren. Andres (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 131) hat oft mit Sublimat gute Resultate erzielt. Grösseren Thieren injizirt er die Lösung durch den Mund und übergiesst sie auch damit. Zuweilen ist Kälte anzurathen: man setzt das Glas mit den Aktinien in Schnee und Salz und lässt später den Eisblock in Alkohol oder einem anderen Fixirmittel zergehen. — Lo Bianco (l. c. p. 448) fixirt je nach der Spezies entweder mit kochender Sublimatlösung (darauf einige Minuten in 1/2 %ige Chromsäure, dann Alkohol) oder mit kalter oder mit Chrompikrinsäure (gleichen Theilen von 1 %iger Chromsäure und Pikrinschwefelsäure) oder mit Chromessigsäure oder mit konzentrirter Essigsäure (Genaueres s. im Original). Neuerdings bringt er auch wohl einige Spezies direkt in Formol.

Duerden (Journ. Inst. Jamaica Vol. 2 1898 p. 449) betäubt die Aktinien mit Magnesiumsulfat und fixirt sie mit 3—5 %igem Formol.

Maceriren. Ueber Hertwigs Gemisch s. oben § 527. Die Gewebe müssen wenigstens 24 Stunden in der Essigsäure bleiben und werden dann in Glycerin zerzupft. — List (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 211) behandelt die Tentakel von *Anthea* und *Sagartia* 10 Minuten lang mit 3 Theilen starkem Flemmingschem Gemisch und 10 Theilen Seewasser, wäscht sie 2 bis 3 Stunden lang mit 1/5 %iger Essigsäure und zerzupft sie in Glycerin; zum Färben nimmt er Pikrokarmin.

862. Korallen mit Kalkskelett sind wegen der grossen Kontraktilität der Polypen schwer zu konserviren. Lo Bianco (l. c. p. 446) verwendet je nach der Spezies Chromessigsäure und kalte oder heisse Sublimatlösung. Schliffe macht man nach Koch und Ehrenbaum (oben § 175 und 178), Schnitte von entkalkten Thieren nach den gewöhnlichen Methoden. S. auch oben § 550 und unten § 863.

863. Alcyonarien. Auch diese haben sehr kontraktile Polypen. In einer früheren englischen Auflage rieth ich (Lee) zum Fixiren

heisse Sublimatlösung oder Eisessig (oben § 81) an; Lo Bianco hat später Aehnliches angegeben.

Garbini (Manuale Tecn. Micr. 4. Ed. Milano 1899 p. 255) fixirt die Polypen ausgestreckt durch Uebergiessen mit Aether und bringt sie dann in Alkohol von 35 %. — Wilson (Mitth. Z. Stat. Neapel 5. Bd. 1884 p. 3) tödtet sie mit einem Gemisch von 1 Theil Essigsäure und 2 Theilen konzentr. Sublimatlösung, nimmt sie aber sofort wieder heraus und härtet sie 2—3 Stunden lang in konzentr. Sublimatlösung.

Braun (Z. Anzeiger 9. Jahrg. 1886 p. 458) übergiesst *Alcyonium, Sympodium, Gorgonia* etc., wenn sie sich gut entfaltet haben, mit einem kochenden Gemisch von konzentrirter Sublimatlösung in Seewasser (20—25 ccm) und 1 %iger Osmiumsäure (4—5 Tropfen), spült sie aber schon nach 5 Minuten mit Seewasser ab und bringt sie in Alkohol von 30 % und allmählich in stärkeren bis 90 %. (Diese Methode eignet sich auch für Bryozoen, Rotatorien und *Hydra*.)

864. Hydroiden. Ueber die Methoden zum Betäuben s. oben § 13 ff.

Fixiren. In der Regel tödtet man die Hydroiden durch Eintauchen in konzentrirte Sublimatlösung und bringt sie sofort in Alkohol; man nimmt gewöhnlich die Lösung kalt für die Gymnoblasten, heiss für die meisten Calyptoblasten. Die Campanulariden lassen sich auch gut durch vorsichtig angewandten Aether fixiren. *Hydra* tödtet man auf dem Objektträger durch einen Tropfen Lösung von Osmiumsäure; Breckenfeld (Amer. Month. Micr. Journ. Vol. 5 1884 p. 49) erhitzt sie auf dem Objektträger in einem Tropfen Wasser 3—5 Sekunden lang über einer Lampe. S. auch oben § 846 und § 863 die Methoden von Zograf und Braun. — Lo Bianco (l. c. p. 451) begiesst die gut ausgestreckten, eventuell mit Cocaïn narkotisirten (s. § 18) Thiere mit heisser konzentrirter Sublimatlösung, bringt sie sofort in Süsswasser und 5 Minuten später in schwachen Alkohol. Für die Tubulariden genügt auch kalte Lösung.

Zum Schneiden bediene man sich der gebräuchlichen Methoden. Ueber die Anwendung von Methylenblau intra vitam s. oben § 300.

865. Medusen. Lo Bianco (l. c. p. 452) fixirt die Hydromedusen je nach der Spezies in ganz verschiedener Weise: die kleinen direkt mit einem Gemisch von 2 Theilen konzentr. Sublimatlösung und 1 Theil Essigsäure, oder mit seinem Gemisch aus Sublimat und Kupfersulfat

(oben § 79), die grösseren erst, nachdem sie durch Essigsäure getödtet worden sind, in seiner Chromosmiumsäure (1 %iger Chromsäure 50, 1 %iger Osmiumsäure 1 Theil) oder in 1 %iger Chromsäure. Für die Scyphomedusen verwendet er entweder direkt 1 %ige Osmiumsäure oder die Chromosmiumsäure oder Chromsäure (Genaueres s. im Original). — Neuerdings braucht er (nach mündlichen Angaben) an Stelle der Osmiumgemische sein Gemisch von Chromsäure und Formol (oben § 109 a).

Nach Bigelow (Mem. Boston Soc. N. H. Vol. 5 1900 p. 193) fixirt man die Scyphistomen von *Cassiopeja* am besten mit Lo Biancos Gemisch von Kupfersulfat und Sublimat, härtet sie in 5 %iger Lösung von Kaliumbichromat, wäscht sie in 35 %igem saurem (etwas Salzsäure) Alkohol und hebt sie in 70 %igem Alkohol auf.

Mir (Lee) hat für die Arten mit langen Tentakeln van Benedens Methode mit Essigsäure (oben § 81) die besten Dienste geleistet. Sie lassen sich durch folgenden Kunstgriff von Lo Bianco fixiren. Man bewege die Schale mit der Essigsäure in der linken Hand so im Kreise, dass die Säure selber lebhaft rotirt, schöpfe inzwischen die Medusen mit möglichst wenig Seewasser in einen Löffel und lasse sie von diesem in die Säure fallen; dann werden sich die Tentakel hinter dem Thiere ganz lang ausstrecken. Auch behandle man jede Meduse für sich, damit sich die Tentakel nicht in einander verwickeln. Sind die Medusen gut fixirt, so bringe man sie sorgfältig in Alkohol.

Schneiden. Paraffin oder Kollodium erlauben wohl von manchen Organen gute Schnitte, taugen aber nicht für alle Gewebe. Die Hertwigs (Nervensystem der Medusen 1878 p. 5) betten die Medusen mit Hülfe von Gummiglycerin in Leber ein und härten das Ganze in Alkohol. Vielleicht könnte man eine der Gefriermethoden, die oben in § 179—182 beschrieben sind, anwenden.

Maceriren. Hierzu eignen sich vor Allem die Methoden der Hertwigs (oben § 527), ohne Zweifel würde aber oft die Reaktion mit Pyrogallussäure (§ 377) noch bessere Resultate liefern. Zur Isolirung der Elemente klopft man am besten sanft auf das Deckglas, das man auf Wachsfüsschen legen mag. Auch ein feiner Pinsel leistet manchmal gute Dienste.

866. Siphonophoren. Bedot (Arch. Sc. Physiq. Nat. Genève (3) Tome 21 1889 p. 556) giesst von einer 15—20 %igen Lösung von Kupfersulfat eine grosse Menge auf einmal zu dem Seewasser mit den Siphonophoren. Nach etlichen Minuten, wenn sie fixirt sind, fügt er einige Tropfen Salpetersäure hinzu, um die Bildung von Niederschlägen zu verhindern, und lässt das Gemisch 4—5 Stunden lang

stehen. Dann gibt er zur Härtung auf je 1 Vol. der Kupferlösung 2 Vol. starkes Flemmingsches Gemisch hinzu und lässt die Thiere wenigstens 24 Stunden darin. Zuletzt bringt er mit einer Pipette so vorsichtig wie möglich einige Tropfen 25 %igen Alkohols hinein und fährt mit dem Verstärken des Alkohols so langsam fort, dass dieser nicht vor 14 Tagen bis zu einer Stärke von 70 % gediehen ist. Zum endgültigen Aufheben dient 90 %iger.

Ich (Lee) habe diese Methode geprüft und finde, sie erhält zwar die Thiere histologisch nicht besser als die gebräuchlichen Methoden, wird aber dadurch werthvoll, dass sie die Siphonophoren unverletzt, d. h. mit allen Anhängen in situ, zu konserviren gestattet.

Friedländer (Biol. Centralbl. 10. Bd. 1890 p. 483) übergiesst die Thiere mit einem Gemisch von 1 Theil Kupfersulfat, 1 Theil Zinksulfat und 8 Theilen Wasser.

Lo Bianco (l. c. p. 454) tödtet die meisten Siphonophoren, indem er in das Seewasser mit den Thieren plötzlich die gleiche oder doppelte Menge seines Gemisches von Kupfersulfat und Sublimat (oben § 79) giesst; als Härtmittel dient ihm dann je nach der Spezies entweder Alkohol von 35 % (nach 2 Stunden 70 %) oder Flemmings Gemisch (2—6 Stunden lang) oder 1 %ige Chromsäure etc. *Rhizophysa* und *Diphyes* jedoch tödtet er mit heisser Sublimatlösung, *Physalia* mit Sublimat und Essigsäure, *Velella* mit Chrompikrinsäure oder Chromsäure und Sublimat, *Porpita* durch Vergiftung mit Pikrinschwefelsäure.

Ueber Korotneffs Methode mit Chloroform s. oben § 15. Ich (Lee) habe *Physophora* sehr gut durch vorsichtigen Zusatz von Aether tödten sehen.

Nach dem Fixiren und Auswaschen lassen sich die Siphonophoren statt in Alkohol auch in Formol aufbewahren (Weber). Davidoff (Anat. Anzeiger 11. Bd. 1896 p. 503) fixirt sie geradezu in Formol: in ein Gefäss voll einer 6—8 %igen Lösung davon stellt er den Glastubus, der die lebendige Siphonophore in Seewasser enthält, schräg (unter einem Winkel von etwa 30°) so auf, dass seine mit Watte locker verschlossene Oeffnung nach unten schaut. Die Formollösung diffundirt durch die Watte in etwa 1 Stunde nach oben und tödtet das Thier ausgestreckt und gut erhalten. Nachher kann man noch Osmiumsäure, Chromsäure etc. darauf einwirken lassen.

867. Ctenophoren. Die kleinen konservirt man mit Osmiumsäure. Für die grösseren verwendet Lo Bianco (l. c. p. 457) je nach der

Spezies entweder sein Kupfersulfat und Sublimat (oben § 79) etc., neuerdings aber auch sein Gemisch aus Formol und Chromsäure (§ 109a).

SAMASSA (Arch. Mikr. Anat. 40. Bd. 1892 p. 157) bettet die Ctenophoren zum Schneiden in Celloidin und Paraffin (oben § 169) ein.

Poriferen.

868. Allgemeines. Die älteren Methoden findet man bei VOSMAER (Bronn, Class. Ordn. Thierreichs 2. Bd. 1884 p. 111—118) angegeben. In erster Linie wird zum Fixiren starker Alkohol, zum Präpariren der Kieselnadeln Kochen mit Salzsäure empfohlen.

869. Ganze Schwämme. Die kleineren Spezies lassen sich recht gut mit den gewöhnlichen Mitteln fixiren, besonders mit Osmiumsäure. Für die grösseren scheint es hingegen noch kein befriedigendes Mittel zu geben. Die Gewebe sind nämlich sehr wasserreich und zart, nach dem Härten sehr brüchig und maceriren auch ungemein leicht. Vielleicht ist für alle Spezies, mit Ausnahme der ganz kleinen, absoluter Alkohol das beste Fixirmittel. Zieht man jedoch ein wässeriges vor, so bringe man nachher den Schwamm ja recht bald in starken Alkohol, um die Maceration unmöglich zu machen.

FIEDLER (Zeit. Wiss. Z. 47. Bd. 1888 p. 87) braucht für *Spongilla* ausser dem absoluten Alkohol eine Lösung von Sublimat in schwachem Alkohol sowie Pikrinschwefelsäure und Flemmings Gemisch.

MINCHIN (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 40 1898 p. 474) fixirt Kalkschwämme, unmittelbar nachdem sie gefischt worden sind, 5—10 Minuten lang in 1%iger Lösung von Osmiumsäure, die mit dem gleichen Quantum Seewasser vermischt ist, und legt sie nach Abspülen mit Wasser in Pikrokarmin auf höchstens 2 Stunden. Zum Einschluss ist Glycerin besser als Balsam. — S. auch unten § 871 (MAAS).

Schneiden. Die Kalkschwämme entkalkt man in Alkohol mit etwas Säure und bettet sie dann wie gewöhnlich ein. Die Kieselschwämme kann man nach Mayer (oben § 567) entkieseln. S. auch § 550.

VOSMAER & PEKELHARING (Verh. Akad. Amsterdam (2) Deel 6 No. 3 1898 p. 43) entkalken in Alkohol mit Pikrinsäure, schneiden dagegen die Kieselnadeln ruhig mit; da sich dann aber die Schnitte leicht vom Objektträger ablösen, so werden sie noch mit Traumaticin (oben § 195) übergossen.

Färben. Von alkoholischen Färbmitteln empfehle ich (LEE) aus eigner Erfahrung speziell die Cochenilletinktur. — LENDENFELD (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 22) verwendet für die Kragenzellen

wässerige Lösungen von Anilinblau und Congoroth. — MINCHIN (l. c. p. 569) färbt die Scheiden der Spicula mit Pikronigrosin nach Freeborn (oben § 767), sonst aber mit Pikrokarmin. — Ueber die intravitale Färbung mit Congoroth etc. nach LOISEL (Journ. Anat. Phys. Paris 34. Année 1898 p. 5, 194 u. 207) s. oben p. 141.

Schleifen. S. oben § 176 die Methode von Johnston-Lavis & Vosmaer.

Ueber das Versilbern s. oben § 359.

870. Skelett. Die Kieselnadeln reinigt man von den Weichtheilen durch Behandlung mit heisser konzentrirter Salpeter- oder Salzsäure oder mit Kali- oder Natronlauge. Die Säuren greifen allerdings zarte Spicula mitunter an; so werden nach DEZSÖ (Arch. Mikr. Anat. 16. Bd. 1879 p. 627) die kleinen sternförmigen in der Rinde von *Tethya lyncurium* von kochender Salzsäure ganz aufgelöst. Daher wird Kalilauge oft bessere Dienste leisten, obwohl sie nicht so reine Präparate gibt. — Nach NOLL ist Eau de Javelle allen diesen Mitteln überlegen (s. oben § 547).

871. Jugendstadien. MAAS (Z. Jahrb. Abth. Morph. 7. Bd. 1894 p. 334) fixirt die Cornacuspongien mit Larven am besten in Flemmings Gemisch (die Larven 1—3 Minuten lang), die freien Larven auch wohl in Hermanns Gemisch. Färbung mit Boraxkarmin oder mit Gentianaviolett und Orange G nach Flemming.

Ueber die Färbung der Eier nach Fiedler s. oben § 335.

MAAS (Zeit. Wiss. Z. 67. Bd. 1900 p. 218) hat bei Syconen die besten Uebersichtsbilder (mit den Nadeln!) durch Fixiren in absol. Alkohol und Färben in Ammoniakkarmin, die besten Schnittbilder durch Flemmings Gemisch und Pikrokarmin erhalten. Auch Sublimatalkohol und hinterher Parakarmin oder Hämalaun ist gut.

DELAGE (Arch. Z. Expér. (2) Tome 10 1892 p. 421) bringt die Deckgläser mit den daran sitzenden Larven von *Spongilla* auf 3 Minuten in absoluten Alkohol, auf eben so lange in 70%igen, auf 10 Minuten in das alkoholische Karmin von Grenacher-Mayer, auf $^1/_2$—2 Minuten in sauren Alkohol, auf je 3 Minuten in 70%igen und absoluten Alkohol, endlich eben so lange in Bergamottöl. Sollen die Larven geschnitten werden, so löst er sie nun ab und bringt sie auf drei Minuten in Paraffin; falls nicht, so kommen sie in situ in einen Tropfen Kanadabalsam, der auf einem anderen Deckglas liegt, sind somit von beiden Seiten her bequem sichtbar. Die Schnitte werden eventuell mit einer ganz schwachen Lösung von Bleu de Lyon nachgefärbt.

Protozoen.

872. Allgemeines. Da die Protozoen als frei lebende Zellen anzusehen sind, so lassen sich natürlich die in der Cytologie gebräuchlichen Methoden und Reagentien meist auch auf sie anwenden. Eins der nützlichsten ist das Methylgrün in saurer Lösung (oben § 281), denn es macht den Kern am raschesten und besten sichtbar (Balbiani & Henneguy in: C. R. Soc. Biol. Paris (7) Tome 3 1881 p. 131).

Nützliche Reagentien, die aber weiter unten nicht erwähnt werden, sind auch schwache Lösungen von Alaun, Kaliumkarbonat oder Borax zur Demonstration der Streifen in der Cuticula und der Insertionen der Cilien bei den Infusorien. — S. auch Maggi, Tecnica protistologica (Milano 1895).

873. Methoden zur Lähmung. Hierher gehören zunächst die Methoden oben § 17—21. Ferner gibt nach Schürmayer (Jena. Zeit. Naturw. 24. Bd. 1890 p. 402) eine schwache Lösung (1 : 10000 oder noch schwächer) von Strychninnitrat bei *Stentor* und *Carchesium* gute Resultate; Antipyrin in konzentrirter Lösung (1 : 1000) oder Cocaïn (1 : 10000) scheinen nur den Stiel der gestielten Ciliaten ausgestreckt zu lähmen.

Eismond (Z. Anzeiger 13. Jahrg. 1890 p. 723) verlangsamt die Bewegungen der Ciliaten (aber auch von kleinen Würmern und Krebsen) rein mechanisch durch Zusatz einer dicken Lösung von Kirschgummi (Gummi arabicum oder andere Klebmittel helfen nicht): die Thiere bleiben an Ort und Stelle, aber die Cilien schlagen ruhig, und alle Lebensprozesse gehen ihren gewohnten Weg. — Certes (Bull. Soc. Z. France 16. Vol. 1891 p. 93) ist damit zufrieden und hat sogar die Thiere intra vitam durch Zusatz von Methylblau oder Dahlia („Violet Dahlia No. 170“) zum Gummi gefärbt. — Jensen (Biol. Centralbl. 12. Bd. 1892 p. 558) verfährt ähnlich wie 1884 der Botaniker Stahl mit *Euglena:* er löst 3 g Gelatine in 100 ccm warmem Wasser auf und mischt von dieser Gallerte einen schwach erwärmten Tropfen mit einem Tropfen Infusorienwasser. Nimmt man weniger (0,8—1%) Gallerte, so kann man die Bewegungen verlangsamen oder auch die Thiere operiren und zerschneiden.

874. Färben intra vitam. Die Methode, Protozoen lebendig zu färben, wurde zuerst von Brandt (Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1878 p. 563), einige Jahre später auch von Certes (s. unten) und von Henneguy (Bull. Soc. Philom. Paris (7) Tome 5 1881 p. 52) beschrieben.

Brandt empfiehlt Bismarckbraun in Lösung von 1 : 3000 und (Biol. Centralbl. 1. Bd. 1881 p. 202) auch eine „verdünnte wässerige Hämatoxylinlösung“ [mit ganz wenig Alaun!] entweder direkt oder nach Bismarckbraun (1 : 5000). — Certes (Bull. Soc. Z. France 6. Vol. 1881 p. 21, 226 u. 264; auch: Z. Anzeiger 4. Jahrg. 1881 p. 208 und 287) verwendet schwache Lösungen von Bismarckbraun, Dahlia etc. und „Hämatoxylin“. Gleich Brandt löst er die Farbstoffe im Infusorienwasser und nimmt sie nur ganz schwach (1 : 10000 und schwächer, von Chinolinblau 1 : 500000).

S. ferner oben § 206 Przesmycki und Loisel (l. c. p. 224) sowie Przesmycki (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1897 p. 480).

Zuweilen ist die Beobachtung der ungefärbten Thiere in einem farbigen Medium nützlich. Hierzu empfiehlt Certes (Bull. Soc. Z. France 13. Vol. 1888 p. 230) eine Lösung von Anilinschwarz, worin die Infusorien wochenlang am Leben bleiben. — Fabre-Domergue (Ann. Micr至gr. Paris Tome 2 1889 p. 545) verwendet eine konzentrirte Lösung von Diphenylaminblau.

875. Fixiren, Schneiden etc. Pfitzner (Morph. Jahrb. 11. Bd. 1885 p. 454) lässt konzentrirte Lösung von Pikrinsäure unter das Deckglas treten. — Blanc (Z. Anzeiger 6. Jahrg. 1883 p. 22) nimmt verdünnte Pikrinschwefelsäure mit einer Spur Essigsäure, Entz (ibid. 4. Jahrg. 1881 p. 575) gibt Pikrinschwefelsäure zu dem Infusorienwasser, Korschelt (ibid. 5. Jahrg. 1882 p. 217) verwendet 1 %ige Osmiumsäure oder für Amöben 2 %ige Chromsäure, Landsberg (ibid. p. 336) ebenfalls Osmiumsäure, bringt aber die Thiere mit einer Pipette in die Säure, statt diese unter das Deckglas treten zu lassen. — Ueber das Fixiren mit Jodjodkalium oder Dämpfen von Jod s. oben § 50. — Cattaneo (Boll. Sc. Pavia Anno 5 1883 p. 89 u. 122; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1885 p. 538) fixirt die Thiere einige Minuten lang mit einer $^1/_8$ %igen wässerigen Lösung von Chlorpalladium, Brass (Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 39) bedient sich des Sublimates oder eines Gemisches von je 1 Theil Chromsäure, Essigsäure und Platinchlorid und 400—1000 Theilen Wasser. — Certes (C. R. Acad. Sc. Paris Tome 88 1879 p. 433) fixirt mit 2 %iger Osmiumsäure (meist mit ihren Dämpfen 10—30 Minuten lang).

Du Plessis (Vogt & Yung, Handb. Prakt. Vergl. Anat. 1. Bd. 1888 p. 85) fixirt die Protozoen mit einer $^1/_5$ %igen Lösung von Sublimat, lässt sie dann eintrocknen, färbt sie und schliesst sie in Balsam ein. Diese etwas rohe Methode soll unter Umständen gute Präparate geben.

Longhi (Boll. Mus. Z. Anat. Comp. Genova No. 4 1892; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 483) empfiehlt zum raschen Tödten der Protozoen eine Lösung von Eserinsulfat (1,1 %), der auf je 10 ccm 1 Tropfen einer 1%igen Lösung von Sublimat zugesetzt ist.

Fol (Lehrbuch p. 102) fixirt die Tintinnen mit seinem Eisenchlorid (oben § 76) und färbt sie dann mit Gerbsäure; dies sei die einzige brauchbare Methode, besonders zur Erhaltung der Cilien. Hierfür empfiehlt Waddington (Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 3 1883 p. 185), zu dem Wassertropfen mit den Infusorien einen Tropfen einer Lösung von 1 Theil Tannin in 4 Theilen Glycerin oder eine Spur einer konzentrirten alkoholischen Lösung von schwefliger Säure (§ 49) zu setzen.

Lo Bianco (l. c. p. 444) konservirt die Gregarinen mit Pikrinschwefelsäure (1 Stunde lang), Vorticellen mit heisser Sublimatlösung, Acineten mit Sublimatlösung in Seewasser oder mit Osmiumsäure; ferner von den Radiolarien *Thalassicolla* mit ½ %iger Chromsäure (1 Stunde lang), die Acanthometren und Aulacanthen direkt mit 50 %igem Alkohol oder mit konzentrirter Sublimatlösung oder durch Zusatz von etwas Osmiumsäure zum Wasser. Für die Sphärozoeen befolgt er die Angaben von Brandt (s. folgenden §).

Zograf fixirt die Rhizopoden und Infusorien wie die Rotatorien (s. oben § 846), aber ohne sie vorher zu betäuben.

Fabre-Domergue (Ann. Micrographie Paris Tome 1 1889 p. 518) fixirt die Protozoen am besten mit Osmiumsäure (1 %) oder einem Gemische gleicher Theile 1 %iger Osmiumsäure und 20 %iger Essigsäure unter dem Deckglase. Auch kann man von vorneherein etwas Methylgrün hinzufügen. Zum Aufbewahren ist gut das Gemisch von Brun (oben § 419) oder verdünntes, leicht mit Methylgrün gefärbtes Glycerin. Einschluss in Balsam wie gewöhnlich. — Derselbe Autor (ibid. Tome 2 1890 p. 50) verwendet für Infusorien eine konzentrirte Lösung von Osmiumsäure, die auch bei der Methode von Balbiani (s. unten) gute Dienste leistet. Zum Schneiden nimmt er jedesmal nur ein einziges, vorher mit Pikrokarmin gefärbtes Thier und bettet es in einem mit Glycerin bestrichenen Uhrschälchen in filtrirtes Paraffin ein. S. auch oben § 135 (Rhumbler).

Balbiani (Z. Anzeiger 13. Jahrg. 1890 p. 133) fixirt *Loxophyllum* in Osmiumsäure (½—1 %ig), färbt es mit Methylgrün und Essigsäure, behandelt es unter dem Deckglas mit schwachem Ammoniak (1—2 Tropfen auf 15—20 ccm Wasser) und wäscht letzteres durch

Methylgrün, das in Wasser ohne Essigsäure gelöst ist, wieder aus. Es zeigen sich dann allerlei Einzelheiten im Kern.

FLORENTIN (Ann. Sc. N. (8) Tome 10 1900 p. 248) fixirt *Spirostomum* mit einem Gemisch von sehr schwacher Osmiumsäure und Eisenchlorid (genauere Angaben fehlen), tingirt es mit Methylgrün und differenzirt die Färbung mit ganz schwachem Aetzammoniak (nach Balbiani).

HOYER (Arch. Mikr. Anat. 54. Bd. 1899 p. 97) fixirt *Colpidium* mit einem Gemisch von 1 Th. 5%iger Lösung von Sublimat und 2 Th. 3%iger Lösung von Kaliumbichromat etwa 1 Stunde lang. Bei wenig Material führt er alle Operationen bis zum Einbetten in einem Glasrohr (5 cm hoch, 7 mm weit) aus, das unten mit Pergamentpapier zugebunden ist, und nimmt letzteres erst ab, wenn das Paraffin im Rohr erstarrt ist.

KARAWAIEW (Z. Anzeiger 18. Jahrg. 1895 p. 286) fixirt *Aulacantha* 1 Tag lang in einem Gemisch von Eisessig und starkem Flemmingschem Gemisch zu gleichen Theilen und bringt sie dann auf 1 bis mehrere Tage in letzteres Gemisch. BORGERT (Z. Jahrb. Abth. Morph. 14. Bd. 1900 p. 207) verwendet Sublimatlösung mit Essigsäure (10 : 2 bis 3; es scheint aber viel ausgezogen zu werden) oder Pikrinosmiumplatinchlorid (oben § 98).

SCHAUDINN (Zeit. Wiss. Z. 59. Bd. 1895 p. 193) fixirt *Calcituba* nur mit 1%iger Osmiumsäure oder einem Gemisch von 1 Theil wässerigem Sublimat mit 2 Theilen absolutem Alkohol; ferner (Anh. Abh. Akad. Berlin 1899 p. 9) *Trichosphaerium* mit einem ähnlichen Sublimatgemisch. Die Kerne von *T.* färbt er mit einer „43%igen alkoholischen Alaunkarminlösung“. Nach dem Fixiren führt er das Auswaschen, Färben etc. mit einer Centrifugalmaschine aus und zerschlägt das Glas erst, wenn das Paraffin darin erstarrt ist.

876. Sphärozoeen. BRANDT (Fauna Flora Golf. Neapel 13. Monogr. 1885 p. 7) empfiehlt je nach der Spezies zum Fixiren entweder $^1/_2$—1%ige Chromsäure ($^1/_2$—1 Stunde lang) oder Jodspiritus (70%igen Alkohol mit der gleichen Menge Seewasser und etwas Jodtinktur; $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde, dann Süsswasser und 30—70%iger Alkohol) oder eine 5—15%ige Sublimatlösung in Seewasser.

877. Sporozoen. WASIELEWSKI (Sporozoenkunde Jena 1896 p. 153) legt besonders grossen Werth auf die Untersuchung der lebendigen Thiere entweder in ihrem natürlichen Medium oder in Normalsalzwasser oder Eiweisslösung (20 ccm Hühnereiweiss, 200 ccm Wasser,

1 g Kochsalz). Zum Fixiren der Gregarinen und Coccidien dienen Osmiumsäure, Sublimat, Pikrinessigsäure, der Myxosporidien Flemmings Gemisch; die Hämosporidien und Acystosporidien werden, auf dem Deckglas angetrocknet, mit Flemmings Gemisch behandelt und mit Methylenblau und Eosin nach Chenzinski (oben § 326) oder mit Delafields Hämatoxylin, Säurefuchsin (oder Bengalroth) und Aurantia gefärbt. Für die Gregarinen sind Färbungen mit Safranin, Pikrokarmin etc., ausserdem Behandlung mit Goldchlorid, Höllenstein, Essigsäure, Ammoniakwasser geeignet, für die Myxosporidien Färbung mit Safranin oder Gentianaviolett und Eosin.

Schaudinn fixirt die Coccidien wie *Trichosphaerium* (oben § 875). S. auch § 878.

Pianese (Arch. Parasit. Paris Tome 2 1899 p. 412) fixirt die mit Coccidien infizirte Leber entweder mit einem Gemisch aus 20 ccm 10%iger wässeriger Lösung von Kobaltchlorid, 5 ccm 2%iger Lösung von Osmiumsäure und 1 Tropfen Ameisensäure, oder mit einem Gemisch von Platinchlorid, Osmiumsäure, Chromsäure und Ameisensäure; in beiden Fällen 36 Stunden lang; Färbung der Paraffinschnitte zum Theil mit recht komplizirten Gemischen.

878. Hämatozoen. Ueber die Färbung s. oben § 326.

Grassi (Atti Accad. Lincei Mem. (5) Vol. 3 1900 p. 357) untersucht Darm, Leibeshöhle und Speicheldrüsen der Mücke *Anopheles* auf die Gegenwart von Malariaparasiten entweder in Normalsalzwasser oder in diesem mit einem Zusatz von 2% Formol (in reinem Formol quellen sie zu sehr) oder in einem Gemisch von 1½ g Kochsalz, 250 ccm Wasser und dem Weissen von einem Ei. Fixirung in Sublimat; Färbung der Paraffinschnitte von ¾—4 μ mit Hämalaun oder Eisenhämatoxylin. Die Sporozoite behandelt er nach Romanowski: er fängt sie in Normalsalzwasser auf, bringt diese Flüssigkeit auf Deckgläser, lässt sie darauf antrocknen, legt die Deckgläser auf 25 Minuten in absol. Alkohol, trocknet sie und färbt mit Eosin und Methylenblau (oben § 326).

Wasielewski & Senn (Zeit. Hyg. 33. Bd. 1900 p. 451) machen zum Studium von *Herpetomonas* Trockenpräparate des Blutes, fixiren diese durch Hitze oder absol. Alkohol und färben ebenfalls nach Romanowski (oben § 326).

879. Flagellaten. Ueber *Herpetomonas* s. den vorigen §.

Lauterborn (Zeit. Wiss. Z. 59. Bd. 1895 p. 170) fixirt die Ceratien vorzugsweise mit Flemmings Gemisch etwa 10 Minuten lang, bringt sie in Alkohol von 35—100%, belässt sie in letzterem 24 Stunden, schafft sie wieder allmählich in Wasser, bleicht sie eventuell durch eine 3%ige Lösung von Wasserstoffhyperoxyd und färbt sie mit Pikrokarmin oder Delafields Hämatoxylin. Ueber das Einbetten in Paraffin s. oben § 135. Färbung der Schnitte mit Eisenhämatoxylin.

Zacharias (Z. Anzeiger 22. Bd. 1899 p. 72) fixirt *Uroglena* etc. mit einem Gemisch aus 2 Vol. konzentr. wässeriger Lösung von Borsäure und 3 Vol. ebensolcher Lösung von Sublimat.

Färben der Geisseln. Von Löfflers Methode (Centralbl. Bakt. 6. Bd. 1889 p. 209; 7. Bd. 1890 p. 629; Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 359; 7. Bd. 1890 p. 368) sei hier die neueste Form gegeben. Zu 10 ccm einer Lösung von 20 g Tannin in 80 ccm Wasser setze man 5 ccm einer gesättigten Lösung von Eisenoxydulammoniumsulfat und 1 ccm einer wässerigen oder alkoholischen Lösung von Fuchsin, Methylviolett oder Wollschwarz. (Hierzu kommt für einige Bacillen eine Spur Natronlauge, für andere eine Spur Essig- oder Schwefelsäure.) Mit einem Tropfen dieses Gemisches werden die auf einem absolut reinen Deckglase in der bekannten Weise angetrockneten Bakterien, Flagellaten etc. $^1/_2$—1 Minute lang erwärmt, bis Dämpfe aufsteigen, in destillirtem Wasser und in absolutem Alkohol gewaschen und ebenso mit einer konzentrirten Lösung von Fuchsin in Anilinwasser behandelt, die man am besten vorher mit einer $^1/_{10}$ $^0/_0$ igen Lösung von Aetznatron bis zum Eintritt der Schwebefällung versetzt hat.

Bunge (Centralbl. Bakt. 16. Bd. 1894 p. 217 und 700; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 96) nimmt zur Beize auf 15 ccm der Tanninlösung 5 ccm verdünnten (1 : 20) Liq. Ferri sesquichlorati und 2 ccm einer gesättigten wässerigen Lösung von Fuchsin; man muss aber dieses Gemisch vor dem Gebrauch einige Zeit an der Luft reifen lassen oder (Journ. R. Micr. Soc. London f. 1895 p. 248) ihm einige Tropfen Wasserstoffhyperoxyd zusetzen, bis es rothbraun wird. Es wird dann umgeschüttelt und direkt auf das Deckglas filtrirt; eine Minute später wird abgespült, das Deckglas getrocknet und gefärbt, am besten mit Karbol-Gentianaviolett.

S. auch Trenkmann (Centralbl. Bakt. 6. Bd. 1889 p. 433; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 79), Brown (Journ. R. Micr. Soc. London f. 1893 p. 268), Julien (ibid. f. 1894 p. 403), van Ermengem (ibid. p. 405), Sclavo (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 96), Hessert (ibid. p. 98: ohne Beize), Bowhil (Centralbl. Bakt. 1. Abth. 23. Bd. 1898 p. 667: Orceïn und Tannin als Beize, dann Gentianaviolett) und Zettnow (Zeit. Wiss. Mikr. 16. Bd. 1899 p. 250, 253 u. 254: Antimonbeize, dann Gold oder Silber).

Fischer (Jahrb. Wiss. Bot. 26. Bd. 1894 p. 188) hat die älteste Methode von Löffler mit Erfolg auf Flagellaten angewandt. S. ferner oben § 326 (Wasielewski & Senn).

Nachträge während des Druckes.

880. (Nachtrag zu § 757.) **Färben der Glia nach Benda** (Neur. Centralbl. 19. Jahrg. 1900 p. 796). Das nach Weigert fixirte und gebeizte Material (s. oben § 757) wird nach gutem Auswaschen auf 2 Tage in $^1/_2$ %ige Lösung von Chromsäure gelegt und dann in Paraffin eingebettet. Die aufgeklebten Schnitte werden entweder a) nur mit schwacher wässeriger Lösung von Hämatoxylin gefärbt (Nachfärbung mit Pikrinsäure und Säurefuchsin) oder b) nach Beizung in Lösung von Eisenalaun oder Eisenoxydsulfat mit einer schwachen wässerigen Lösung von Natriumalizarinsulfat und nach „Eintauchen in destillirtes Wasser und Abtupfen mit Fliesspapier“ mit einer $^1/_{10}$ %igen wässerigen Lösung von Toluidinblau; hierauf Abspülen in 1 %iger Essigsäure, Ueberführen in absoluten Alkohol, Differenziren in Kreosot; zum Schluss Xylol und Balsam; oder c) mit schwacher wässeriger Lösung von Hämatoxylin; dann Differenziren in 30 %iger Essigsäure, bis der Schnitt blaugrau ist, Nachfärben mit Methylviolett (nach Weigert) oder mit Gentianaviolett (nach Ehrlich) oder mit Kristallviolett (Benda), Nachbehandeln mit Jodjodkalium, Differenziren in ein Gemisch gleicher Theile von Anilin und Xylol, endlich Balsam.

Zur Färbung mit Kristallviolett (p. 792) dient ein Gemisch von 1 Vol. gesättigter Lösung dieses Farbstoffes in 70 %igem Alkohol, 1 Vol. 1 %iger Lösung von Salzsäure in 70 %igem Alkohol und 2 Vol. Anilinwasser.

Bei der 2. Art der Färbung bildet das Eisenalizarin eine „Art Beize für die basischen Anilinfarben“, und es bedarf dann energischer Mittel, um die diffuse Tinktion in eine elektive umzuwandeln. Das Natriumalizarinsulfat ist in 70 %igem Alkohol gelöst, und hiervon wird dem Wasser so viel zugesetzt, dass es bernsteingelb wird; die Schnitte werden hierin in 24 Stunden braunroth.

881. (Nachtrag zu § 294 u. 777.) Bindet man sich genau an Weigerts Vorschrift, so resultirt eine alkoholische Lösung, die unter

Anderem etwas freies Eisenchlorid enthält. Eine solche aber färbt, wie ich (Mayer) finde, präziser und dunkler, als wenn man den Niederschlag erst sorgfältig auswäscht, ehe man ihn in Alkohol löst. Ein absichtlicher Zusatz von äusserst wenig Eisenchlorid zum fertigen Gemisch bewirkt dasselbe und verhindert auch, dass sich Knorpel und Schleim mitfärben, falls solche in den Präparaten vorhanden sind. (Weigert gibt selber an, dass ein „chemisch reinerer“ Farbstoff nicht dunkel genug färbe.) Auch dem Kresofuchsin setzt man, wenn es nur zur Färbung der elastischen Fasern dienen soll, vortheilhaft etwas Eisenchlorid zu.

882. (Nachtrag zu § 206.) Fischel (Anat. Hefte 1. Abth. 16. Bd. 1901 p. 417 ff.) hat neuerdings gegen 100 Farbstoffe auf ihre Verwendbarkeit zur intravitalen Färbung an Larven von Amphibien geprüft. Es ergibt sich, dass das lebende Gewebe dieser Thiere saure Farbstoffe (im Sinne Ehrlichs) gar nicht aufnimmt, und von basischen auch nur gewisse. Die Färbung ist wirklich intravital, und die sich färbenden Granula sind allermeist lebende Theile des Plasmas. Der Kern färbt sich absolut nicht. Am besten eignen sich zur Färbung Bismarckbraun, Methylenblau rectif., Neutralviolett sowie Nilblauchlorhydrat und -sulfat, ganz besonders aber Neutralroth. In sehr seltenen Fällen nehmen die Granula gleichzeitig zwei Farbstoffe (Bismarckbraun und Neutralroth) auf.

883. (Nachtrag zu § 767.) White (Journ. Anat. Phys. London Vol. 35 1901 p. 145) benutzt zum Unterscheiden von Bindegewebe und glatten Muskeln auf Schnitten ein Gemisch von Erythrosin und Calciumpikrat, gibt aber selbst an, dass bei zu kurzem Färben die Pikrinsäure, bei zu langem das Erythrosin die Oberhand gewinne.

884. Zur Färbung der Axencylinder bringt Fajersztajn (Neur. Centralbl. 20. Jahrg. 1901 p. 98) die Gefrierschnitte von Material, das am besten in 5—10%igem Formol gehärtet worden ist, nach gutem Auswaschen des Formols in eine Lösung von Silberoxydammoniak, reduzirt sie sofort in 5%igem Formol, wäscht sie aus und behandelt sie, um sie haltbar zu machen, mit Gold- oder Platinchlorid. Einschluss in Balsam wie gewöhnlich. In der Regel werden nur die Axencylinder gefärbt (nicht imprägnirt), zuweilen aber auch die Nervenzellen, Blutkörperchen, Gliazellen etc. Bereitung des Silberbads: eine 2%ige Lösung von Höllenstein (in destill. Wasser) wird mit Ammoniak gefällt, und der Niederschlag durch Zusatz von Ammoniak fast ganz aufgelöst; beim Gebrauch muss diese Lösung, die sich im Dunkeln Wochen lang hält, je nach den Schnitten mit etwas Ammoniak, das die Reduktion durch das Formol hemmt, oder mit Natronlauge oder Barytwasser, die sie beschleu-

nigen, versetzt werden; das geeignete Gemisch ist jedesmal eigens auszuprobiren. (Die Schnitte von Material aus Chromgemischen werden zunächst in einer stark ammoniakalischen Silberlösung vom freien Chromate befreit, ehe sie in das eigentliche Silberbad kommen.) Ist die Färbung zu schwach ausgefallen, so sind die gesammten Prozeduren 1 oder 2 Mal zu wiederholen. Zur Vergoldung dient eine $^1/_3$ $^0/_0$ige Lösung von Goldchlorid, von der 1—3 Tropfen mit 10 bis 15 ccm Alkohol von 90 $^0/_0$ verdünnt werden; die Schnitte bleiben hierin 12 bis 24 Stunden lang im Dunkeln.

885. (Nachtrag zu § 184.) Regaud (Bibliogr. Anat. Paris Tome 9 1901 p. 51) bringt die beliebig aufgeklebten Schnitte aus dem Xylol in Alkohol von 100 oder 95 $^0/_0$, dann auf $^1/_2$—2 Minuten in verdünntes Kollodium und von da nach gutem Abtropfenlassen in Alkohol von 70 oder 80 $^0/_0$. Sie lösen sich nun auch beim Färben in wässerigen Gemischen nicht ab.

886. (Nachtrag zu § 536.) Freud (Centralbl. Med. Wiss. 17. Jahrg. 1879 p. 468) macerirt zur Isolirung der Nerven höherer Wirbelthiere die Gewebe 2—4 Tage lang in einem Gemisch von 1 Theil Salpetersäure, 1 Theil Glycerin und 3 Theilen Wasser. Die Salpetersäure muss „je nach Bedürfniss mehr oder weniger Untersalpetersäure enthalten“. Auch für Schleimdrüsen, Haare etc. ist das Gemisch brauchbar.

Königstein (Sitzungsb. Akad. Wien 71. Bd. 3. Abth. 1875 p. 301) macerirt die vergoldete Cornea in einem Gemisch gleicher Theile von rauchender Salzsäure, Glycerin und Wasser. — Freud (ibid. 78. Bd. 1879 p. 102) macerirt Goldpräparate von Nerven in einem ähnlichen Gemisch (Salzsäure 10, Wasser 7, Glycerin 3). Das Glycerin hält die macerirten Gewebe geschmeidig.

887. (Nachtrag zu § 843.) Langdon (Journ. Comp. Neur. Granville Vol. 10 1900 p. 4) injizirt bei *Nereis* eine starke Lösung des Methylenblaus in die Leibeshöhle, legt das Thier (in Seewasser) auf einige Stunden ins Dunkle und findet dann viel mehr nervöse Elemente gefärbt als im Hellen. Der Zutritt der Luft ist dagegen nicht nöthig. Weiterbehandlung nach Bethe. Die Paraffinschnitte dürfen wohl mit Eiweiss, nicht aber mit Wasser aufgeklebt werden, da dieses die Färbung zu beschädigen scheint. Nachfärbung mit Cochenilletinktur. Die Schnitte haben sich bereits 3 Jahre lang unverändert gut erhalten.

888. (Nachtrag zu § 590.) Adler (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 18. Bd. 1901 Sep. p. 2) fixirt die Eier von *Bufo* in einem Gemisch gleicher Theile von konzentr. Sublimatlösung und $^1/_2$ $^0/_0$iger Chromsäure, entfernt die Gallerte durch Eau de Javelle, färbt die Eier mit Alauncochenille und bringt sie in Paraffin. Im absol. Alkohol, Chloroform und Chloroform-Paraffin können sie Tage lang bleiben, ohne brüchig zu werden, dagegen dürfen sie nur 15 bis 30 Minuten im definitiven geschmolzenen Paraffin verweilen.

889. Ueber Blutplättchen s. auch Deetjen (Arch. Path. Anat. 164. Bd. 1901 p. 260), über Fettfarbstoffe Michaelis (ibid. p. 263).

Register.

Die Zahlen geben die **Seiten** an. ä = ae, ö = oe, ü = ue. Was man bei C nicht findet, suche man bei K.

Folge erscheinen. Nach Abschluss einer jeden in mehreren Lieferungen behandelten Hauptabteilung erscheint ein Gesamtregister.

Jede Lieferung ist einzeln käuflich. Dem Umfang entsprechend ist der Preis der Lieferungen verschieden; jedoch wird für die Subskribenten, die sich auf 5 Jahre hinaus für die Abnahme aller in diesem Zeitraum erscheinenden Lieferungen verpflichten, der Berechnung der durchschnittliche Preis von Mark 0,70 für den Druckbogen zu Grunde gelegt. Der Einzel-Ladenpreis für jede vollständige Lieferung erhöht sich gegen den Subskriptionspreis um ein Drittel.

Erschienen sind:

Probelieferung. *(Protozoa.)* **Heliozoa.** Bearbeitet von F. Schaudinn (Berlin). 24 Seiten mit 10 Abbildungen. 1896. **Preis Mark 1,50.**

1. Lieferung. *(Aves.)* **Podargidae, Caprimulgidae** und **Macropterygidae.** Bearbeitet von E. Hartert (Tring). VIII und 98 Seiten mit 16 Abbildungen und 1 Beilage (Terminologie des Vogelkörpers, von A. Reichenow 4 Seiten mit 1 Abbildung). 1897 II.
Subskriptionspreis Mark 4,50. Einzelpreis Mark 7,—.

2. Lieferung. *(Aves.)* **Paradiseidae.** Bearbeitet von The Hon. W. Rothschild. VI und 52 Seiten mit 15 Abbildungen. 1898 IV.
Subskriptionspreis Mark 2,80. Einzelpreis Mark 3,60.

3. Lieferung. *(Acarina.)* **Oribatidae.** Bearbeitet von A. D. Michael (London). XII und 93 Seiten mit 15 Abbildungen. 1898 VII.
Subskriptionspreis Mark 4,50. Einzelpreis Mark 6,80.

4. Lieferung. *(Acarina.)* **Eriophyidae (Phytoptidae).** Bearbeitet von A. Nalepa (Wien) IX und 74 Seiten mit 3 Abbildungen. 1898 VIII.
Subskriptionspreis Mark 3,80. Einzelpreis Mark 5,—.

5. Lieferung. *(Protozoa.)* **Sporozoa.** Bearbeitet von A. Labbé (Paris). XX und 180 Seiten mit 196 Abbildungen. 1899 VII.
Subskriptionspreis Mark 8,80. Einzelpreis Mark 12,—.

6. Lieferung. *(Crustacea.)* **Copepoda, I. Gymnoplea.** Bearbeitet von W. Giesbrecht (Neapel) und O. Schmeil (Magdeburg). XVI und 169 Seiten mit 31 Abbildungen. 1898 XII.
Subskriptionspreis Mark 8,40. Einzelpreis Mark 11,—.

7. Lieferung. *(Acarina.)* **Demodicidae** und **Sarcoptidae.** Bearbeitet von G. Canestrini (Padua) und P. Kramer (Magdeburg). XVI und 193 Seiten mit 31 Abbildungen. 1899 IV.
Subskriptionspreis Mark 9,20. Einzelpreis Mark 12,—.

8. Lieferung. *(Arachnoidea.)* **Scorpiones** und **Pedipalpi.** Bearbeitet von K. Kraepelin (Hamburg). XVIII und 265 Seiten mit 94 Abbildungen. 1899 III.
Subskriptionspreis Mark 12,60. Einzelpreis Mark 17,—.

9. Lieferung. *(Aves.)* **Trochilidae.** Bearbeitet von E. Hartert (Tring). IX und 254 Seiten mit 34 Abbildungen. 1900 II.
Subskriptionspreis Mark 12,—. Einzelpreis Mark 16,—.

10. Lieferung. (*Vermes.*) **Oligochaeta.** Bearbeitet von W. Michaelsen (Hamburg). XXIX und 575 Seiten mit 13 Abbildungen. 1900 X.
Subskriptionspreis Mark 26,60. Einzelpreis Mark 35,—.

11. Lieferung. (*Orthoptera.*) **Forficulidae** und **Hemimeridae.** Bearbeitet von A. de Bormans (Turin) und H. Krauss (Tübingen). XV und 142 Seiten mit 47 Abbildungen. 1900 X.
Subskriptionspreis Mark 7,—. Einzelpreis Mark 9,—.

12. Lieferung. (*Arachnoidea.*) **Palpigradi** und **Solifugae.** Bearbeitet von K. Kraepelin (Hamburg). XI und 159 Seiten mit 118 Abbildungen. 1901 II.
Subskriptionspreis Mark 8,—. Einzelpreis Mark 10,—.

13. Lieferung. (*Acarina.*) **Hydrachnidae** und **Halacaridae.** Bearbeitet von R. Piersig (Annaberg) und H. Lohmann (Kiel). XVIII und 336 Seiten mit 87 Abbildungen. 1901 VI.
Subskriptionspreis Mark 16,—. Einzelpreis Mark 21,—.

14. Lieferung. (*Lepidoptera.*) **Libytheidae.** Bearbeitet von A. Pagenstecher (Wiesbaden). IX und 18 Seiten mit 4 Abbildungen. 1901 II.
Subskriptionspreis Mark 1,50. Einzelpreis Mark 2,—.

15. Lieferung. (*Aves.*) **Zosteropidae.** Bearbeitet von O. Finsch (Leiden). XIV und 55 Seiten mit 32 Abbildungen. 1901 III.
Subskriptionspreis Mark 3,60. Einzelpreis Mark 4,80.

Im Druck befinden sich:

16. Lieferung. (*Mollusca.*) **Cyclophoridae.** Bearbeitet von W. Kobelt (Schwanheim).

17. Lieferung. (*Aves.*) **Paridae, Sittidae** und **Certhiidae.** Bearbeitet von K. Hellmayr (Wien).

Es wird ersucht, Subskriptions-Anmeldungen baldigst an die unterzeichnete Verlags-Buchhandlung direkt, oder durch Vermittelung anderer Buchhandlungen, zu richten.

Berlin, Juni 1901.
NW., Carlstr. 11.

R. Friedländer & Sohn.



Date Due

26 JUL '68 CLM			

Demco 293-5

